

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Učitelství biologie a chemie pro střední školy



Bc. Ivana Káráká

Rozdíly v obsahu sekundárních metabolitů jako vysvětlení úspěchu invazních druhů

Differences in content of secondary metabolites as a factor explaining success of invasive species

Diplomová práce

Vedoucí závěrečné práce: doc. RNDr. Zuzana Münzbergová, Ph.D.

Praha 2014

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze 14.8.2014

.....

Ivana Kárská

Poděkování

Ráda bych poděkovala všem, kteří mi při vzniku této práce jakkoli pomohli, ať už slovem, myšlenkou či přítomností.

Můj velký dík patří paní školitelce doc. RNDr. Zuzaně Münzbergové Ph.D, za její velmi ochotný a obětavý přístup a velkou pomoc se statistickým zpracováním dat a bleskové odpovídání na emaily. Stejně tak kolektivu z laboratoře biotechnologie rostlin UEB AV ČR v.v. i, především panu Mgr. Petrovi Maršíkovi, Ph.D.za velice ochotný, trpělivý, povzbuzující přístup a velkou pomoc s praktickou částí diplomové práce.

Ráda bych poděkovala rodičům a sourozencům, kteří po celou dobu psaní diplomové práce kolem mě šířili dobrou náladu, podporovali mě a všemožně mi pomáhali. Stejně tak děkuji Vojtovi, Jáje, Páje, Janče za podporou a motivaci a vřelou pomoc a rozveselení.

Abstrakt

Vlivem antropogenní činnosti se řada druhů rostlin dostala do nového prostředí a zde se staly invazními. Existuje řada hypotéz, které se snaží o vysvětlení úspěšnosti invazních druhů rostlin. Jednou z takových hypotéz je EICA, která říká, že rostliny v invazním areálu se nesetkávají se svými původními nepřáteli a v důsledku toho tvoří méně sekundárních metabolitů než rostliny v areálu původním. Ušetřenou energii mohou nepůvodní rostliny investovat do biomasy.

Tato práce navazuje na zahradní experiment, který v letech 2007-2010 provedla Inés Abela-Hofbauerová. Rostliny pcháče osetu (*Cirsium arvense*) ze zmíněného experimentu posloužily ke zkoumání rozdílů v obsahu vybraných fenolických kyselin a flavonoidů v invazních a původních rostlinách. Rostliny byly pěstovány v pokusné zahradě v České republice ze semen získaných z mateřských rostlin z původního areálu v Evropě (Česká republika a Španělsko) a invazního areálu v Severní Americe (Illinois a Nebraska). Po celou dobu růstu, byly rostliny chráněny před napadením herbivorů. Z listů rostlin byly připraveny metanolové extrakty, které jsem následně analyzovala metodou HPLC (vysokoúčinná kapalinová chromatografie).

Ve vzorcích jsem detekovala jedenáct fenolických kyselin a tři flavonoidy. Stejně fenolické látky se vyskytovaly jak v rostlinách z původního tak invazního areálu. Výsledky podporují hypotézu EICA, protože ve vzorcích z původního areálu byla zvýšená koncentrace fenolických látek oproti rostlinám z nepůvodního areálu ze Severní Ameriky. V invazním areálu byla prokazatelně vyšší koncentrace, kyseliny chlorogenové. Byly patrné i rozdíly v koncentraci fenolických látek v jednotlivých státech, kdy se vzorky z České republiky nápadně odlišovaly od ostatních.

Klíčová slova: HPLC, invazní rostlina, fenolické kyseliny, flavonoidy, EICA, SDH, *Cirsium arvense*, sekundární metabolity, původní areál, invazní areál

Abstrakt

A lot of plant species got into new environment and there they became invasive species by the influence of the anthropogenic activity. There are many hypotheses which deal with explanation of success of the plant invasive species. One of these hypotheses is called EICA. This says that the plants in the invasive range do not meet their natural enemies, and therefore they create less secondary metabolites than plants in the native range. The non-native plants can invest their spare energy into biomass.

This thesis is built on a garden experiment done by Inés Abela- Hofbauer from 2007 to 2010. The plants (*Cirsium arvense*) used in that experiment were used for investigation of differences in volume of chosen phenolic acids and flavonoids in invasive and native species. The plants were grown from seeds from a native range in Europe (Czech Republic and Spain) and an invasive range in North America (Illinois and Nebraska) in an experimental garden in the Czech Republic. During the growing period the plants were protected from the herbivores. Methanol extracts were made of the leaves of these grown plants. I analysed them with HPLC method (high-performance liquid chromatography).

I have detected 11 phenolic acids and 3 flavonoids in the samples. The same phenolics occurred in plants from both native and invasive range. The results support the EICA hypothesis. There was a higher concentration of the phenolics in the samples from the native range than in the plants from the invasive range in North America. There was a higher concentration of chlorogenic acid in the invasive range. There were also differences in concentration of phenolics in different countries; the Czech samples were significantly different to the others.

Keywords: HPLC, invasive plant, phenolic acids, flavonoids, EICA, SDH, *Cirsium arvense*, secondary metabolites, native range, invasive range

Obsah

Poděkování.....	3
Abstrakt.....	4
Abstrakt.....	5
Použité zkratky.....	8
1 Úvod.....	9
1.1 Nepůvodní druhy rostlin	9
1.1.1 Hypotéza úniku před nepřáteli (ERH) - The Enemy Releases Hypothesis	9
1.1.2 Hypotéza „Evoluce zvýšené konkurenční schopnosti“ (EICA) -Evolution of Increased Competitive Ability	10
1.1.3 SDH (Shifting defence hypothesis).....	11
1.2 <i>Cirsium arvense</i> (L.) Scop -pcháč rolní (oset)	12
1.2.1 Světové rozšíření <i>Cirsium arvense</i>	13
1.2.2 Regulace <i>Cirsium arvense</i>	14
1.2.3 Sekundární metabolity v rodě <i>Cirsium</i>	15
1.3 Sekundární metabolity v <i>Cirsium arvense</i>	17
2 Cíle práce	18
3 Metodika	19
3.1 Zdroj rostlinného materiálu.....	19
3.1.1 Místa odběru mateřských rostlin	19
3.1.2 Zahradní experiment	19
3.2 Extrakce listů (<i>Cirsium arvense</i>).....	20
3.3 Analýza extraktů z listů (<i>Cirsium arvense</i>).....	22
3.3.1 Příprava standardů.....	26
3.3.2 Příprava kalibrační řady standardů.....	26
3.3.3 Příprava analyzovaných vzorků	27
3.3.4 Kvalitativní a kvantitativní HPLC analýza	27
3.3.5 Výběr dat pro statistickou analýzu	28
3.4 Statistická analýza.....	28
4 Výsledky	30
4.1 HPLC analýza fenolických látek.....	30
4.2 Statistické vyhodnocení vzorků	34
4.2.1 Variabilita fenolických látek ve vzorcích.....	34
4.2.2 Rozdíly v obsahu fenolických látek v závislosti na původním/invazním areálu.....	37

4.2.3	Rozdíly obsahu fenolických látek v závislosti na státu	39
5	Diskuze.....	45
5.1	Sekundární metabolity v pcháči osetu (<i>Cirsium arvense</i>).....	45
5.2	Závislost množství fenolických látek na areálu (původní/nepůvodní).....	46
5.3	Rozdíly v obsahu fenolických látek v závislosti na státu	47
6	Závěr.....	48
7	Seznam literatury	49
8	Přílohy	54

Použité zkratky

HPLC – vysokoúčinná kapalinová chromatografie

PCA – analýza hlavních komponent

RDA – redundanční analýza

BHT – (2,6-di-tert-butyl-p-cresol)

PDA detektory – Detektory diodového pole

EICA – Hypotéza zvýšené evoluční konkurenční schopnosti

ERH – Hypotéza úniku před nepřáteli

SDH – Shifting defence hypothesis

R² – Koeficient determinace

UV – ultrafialové záření

ILL – Illinois

NB – Nebraska

ČR – Česká republika

ŠP – Španělsko

P – původní

I – invazní

1 Úvod

1.1 Nepůvodní druhy rostlin

Biologické invaze jsou důsledkem ať už úmyslné či neúmyslné antropogenní činnosti. Díky cestování a obchodu dochází k přemísťování druhů do nových míst, kde často invadují člověkem narušená nebo změněná stanoviště (Müller-Schärer, Schaffner, and Steinger 2004). Marková a Hejda (2011) poukazují na vliv náhlé změny frekvence a disturbance, která vede ke zvýšení dostupnosti zdrojů a snadnějšímu uchycení invazního druhu v původním společenstvu. Z velkého počtu rostlin, které se v posledních 520 letech rozšířily do nových biotopů, jen malá část druhů úspěšně napadla přirozená společenstva a začala se hojně množit a rozrůstat (Williamson and Fitter 1996). Za invazní druhy považujeme druhy, které se dokázaly v novém prostředí naturalizovat a vytvořit velkou populační hustotu, která představuje hrozbu pro biologickou rozmanitost (Jäger, Tye, and Kowarik 2007) a potažmo i velkou finanční zátěž (Catford et al. 2012). Proběhla řada biogeografických srovnání a zahradních experimentů s rostlinami z původních a nepůvodních areálů, které naznačují, že rostliny nepůvodní mají různě geneticky založené fenotypy oproti rostlinám z areálů původních (Bossdorf et al. 2005). Bylo předloženo několik hypotéz, vysvětlují úspěchy invazních druhů, které zohledňují vliv interakce s biotickým a abiotickým prostředím.

1.1.1 Hypotéza úniku před nepřáteli (ERH) - The Enemy Releases Hypothesis

Tato hypotéza pracuje s předpokladem, že přirození nepřátelé (herbivoři, patogeny) jsou důležitými regulátory rostlinné populace. Očekává, že invazní rostliny mají výhodu oproti původním druhům rostlin, kvůli snížení vlivu přirozených nepřátel v novém invadovaném prostředí (Keane and Crawley 2002). Rostliny jsou tedy v nepůvodním prostředí vitálnější a méně napadené hmyzem (Colautti et al. 2004).

Cripps et al. (2010) provedli porovnávací experiment s rostlinami *Cirsium arvense* z původního evropského areálu a invazního areálu na Novém Zélandu. Pozorovali 13 populací (7 na severním a 6 na jižním ostrově) na Novém Zélandu a 12 populací ve střední Evropě. Zjistili, že suchá hmotnost výhonku byla větší na jižním ostrově v porovnání s Evropou, ale severní ostrov se od Evropy nelišil. Evropské populace měly větší napadení úborů, stonků a výhonků v porovnání s rostlinami z Nového Zélandu.

1.1.2 Hypotéza „Evoluce zvýšené konkurenční schopnosti“ (EICA) -Evolution of Increased Competitive Ability

Tato hypotéza vysvětluje úspěšnost invazních rostlin jako důsledek oproštění od svých přirozených nepřátel. Naznačuje, že zavlečené druhy jsou úspěšnější, vzrostlejší nebo plodnější ve srovnání s druhy ve svém původním prostředí. Jako vysvětlení uvádí, že díky absenci specializovaných herbivorů nemusí rostlina plýtvat silami na produkci látek, které by ji chránily před poškozením, a mohou investovat energii do růstu a rozmnožování. Tak se stávají konkurenceschopnější v boji s rostlinami na stanovišti (Blossey and Nötzold 1995). Je to tedy volba kompromisu, ve kterém byla podpořena ztráta energeticky nákladné obrany ve prospěch růstu a plodnosti (Blossey and Nötzold 1995). Existuje celá řada experimentů zkoumajících aplikovatelnost hypotézy EICA na chování invazních druhů (Felker-Quinn, Schweitzer, and Bailey 2013).

Abela-Hofbauerová and Münzbergová (2011) provedly zahradní experiment s rostlinami (*Cirsium arvense*) z původního areálu v Evropě a z invazního areálu v Severní Americe. Rostliny byly pěstovány v písčité a na živiny bohaté půdě, v podmínkách chránící rostlinu před kontaktem s herbivory. Areál rozšíření měl vliv na nadzemní biomasu, kdy rostliny z původního areálu dosahovaly menší velikosti než ty z areálu nepůvodního, rozdíl byl patrný především v písčité půdě.

Liu et. al. (2013) popisují experiment s invazní trávou sveřepem střešním (*Bromus tectorum*), který se hojně rozrůstá v Severní Americe, kde podporuje vznik požárů. V této studii se zaměřili na porovnávání morfologie semen *Bromus tectorum* získaných ze Spojených států, Kazachstánu a Číny. Byla porovnávána velikost, tloušťka krycí vrstvy, délka osiny a mikromorfologická struktura diaspor. Výsledky ukazují, že v nepůvodních prostředích byla tloušťka pluchy a plušky tenčí, což může usnadňovat klíčení, ale na úkor obranyschopnosti. I délka osiny byla větší u nepůvodních druhů rostlin, což může napomáhat šíření a kotvení diaspor.

Dalším příkladem podporujícím EICA je experiment provedený na ambrozii peřenolisté (*Ambrosia artemisiifolia*) v kontaktu s jejím specializovaným herbivorem z čeledi mandelinkovitých (*Ophraella communa*). Ambrozie invadovala ze Severní Ameriky do Japonska. Pro potřeby pokusu byla sebrána semena ze severoamerických a japonských populací. Z Japonska byly vybrány populace, které se jednak nikdy neselektovaly se zmiňovaným herbivorem, ale i populace rostoucí na místech, kde se již několik let vyskytoval. Rostliny byly pěstovány ve společné zahradě v Japonsku s přidavkem herbivora. Nepůvodní japonské populace získané z míst herbivora prostého,

v kontaktu s herbivorem vykazovaly oslabenou obranu, ale vyšší tempo růstu než populace z původního areálu. Naopak u rostlin, které již měly zkušenost herbivorem, byla míra napadení menší. Tyto výsledky podporují hypotézu EICA a naznačují, že obranná schopnost je reverzibilní s výskytem specializovaného herbivora (Fukano and Yahara 2012). Dalším příkladem je pokus mapující herbářové sbírky pastináku setého, invazní rostliny v Severní Americe. Rostliny herbářované v časovém rozmezí 1850-1889 obsahují nižší množství furanokumarinu než ty rostliny, které byly sebrány po zavlečení původního specialisty *Depressaria pastinacella* (Lepidoptera: Oecophoridae (Zangerl and Berenbaum 2005).

1.1.3 SDH (Shifting defence hypothesis)

Tato teorie rozšiřuje hypotézu EICA a pokouší se objasnit problémy, které nastaly v řadě experimentů, které porovnávaly obsah sekundárních látek v rostlinách. V řadě případů totiž nebylo pozorováno snížení sekundárních látek, jak předpokládá EICA, ale v některých případech byla tendence opačná. Například ve starčku přímětníku (*Senecio jacobaea*) bylo stanoveno větší množství pyrolizidinových alkaloidů v nepůvodních rostlinách ve srovnání s původními rostlinami (Joshi and Vrieling 2005).

Tato hypotéza navrhuje, že v nepůvodním areálu se invazní rostlinné druhy rychleji vyvíjejí k nové rovině obrany, protože se sice oprostily od svých specializovaných herbivorů, ale stále jsou pod útokem místních nespecializovaných herbivorů (Doorduyn and Vrieling 2011). Nejen změna koncentrace, ale i změna v kompozici chemické sloučeniny mezi jednotlivci může být výhodou pro rostliny v novém prostředí (Wolf et al. 2011). Připomíná nutnost rozlišování chemické rostlinné obrany na kvalitativní (alkaloidy, glukosinoláty, terpenoidy) a kvantitativní obranu (fenolické látky, taniny, lignin) (Doorduyn and Vrieling 2011; Procházka et al. 1988). Wolf et al. (2011) uvádí zahradní experiment s rostlinou vratičem obecným (*Tanacetum vulgare*). Rostliny byly vypěstovány ze semen z původního a invazního areálu. Rostliny z obou areálů se shodovaly v množství biomasy, ale rostliny z nepůvodního měly delší stonky a vyšší zastoupení terpenů.

Huberty et al. (2014) představují experiment, ve kterém zkoumali SDH hypotézu s rukví rakouskou (*Rorippa austriaca*). Neobjevili rozdíly v obsahu glukosinolátů v rámci areálu (původní/nepůvodní), ale zjistili rozdíly v obsahu mezi populacemi. Experiment probíhal ve skleníku za řízených i neřízených podmínek. Rostliny byly vypěstovány

z populací invazních rostlin z Německa a Nizozemí a z původních rostlin z České republiky.

1.2 *Cirsium arvense* (L.) Scop -pcháč rolní (oset)

Pcháč oset je vzpřímená, diploidní ($2n = 34$), vytrvalá, mírně až značně ostnitá, bylina z čeledi hvězdnicovitých (*Asteraceae*), schopná dorůst i více jak 150 cm (Tiley 2010). Často bývá považován za jeden z nejhorsších plevelů na světě (Bacher and Schwab 2000). Pro růst rostliny jsou příhodné jílovité, vápnité, písčité čerstvě vlhké až sušších půdy. Oset je schopen růst téměř v každé půdě, ale nedaří se mu v příliš zamokřených půdách (Moore 1975). Preferuje slunná místa, případně v polostínu jak na zemědělské půdě, kde roste mezi jednoletými i víceletými plodinami, na polích, v sadech, chmelnicích, vinicích, školkách apod., tak i na nezemědělské půdě na travnatých světlinách podél listnatých i jehličnatých lesů, vlhčích pastvinách a loukách a na ruderalních stanovištích (navážkách, výsypkách, lomových odvalech, prostorách podél komunikací, opuštěných polích a ruderalizovaných pasekách) (Mikulka 2013; Nuzzo 1997).

Mladé rostliny vytvářejí listové růžice, ze které vyrůstá tuhá jemně rýhovaná lodyha, která je v horní části bohatě větvená, téměř po celé délce olistěná nebo lysá či v horní části pavučinatá (Bureš 2004). Přízemní listy v růžici jsou vejčitě obkopinaté, celistvé až peřenolaločné a velmi brzy zasychají. Střední lodyžní listy jsou tvarově velice různorodé (podlouhle celistvé až vyhlodávané s okrajem nezkadeřeným, celokrajným, brvitým až měkce ostnitým nebo s okrajem silně zkadeřeným a ostnitým), na líci zelené, mohou být jak lysé tak i hustě běloplstnaté s víceméně vyniklou žilnatinou. Listy na bázi klínovitě přisedají srdčitou bází nebo jsou dlouze sbíhavé (Bureš 2004).

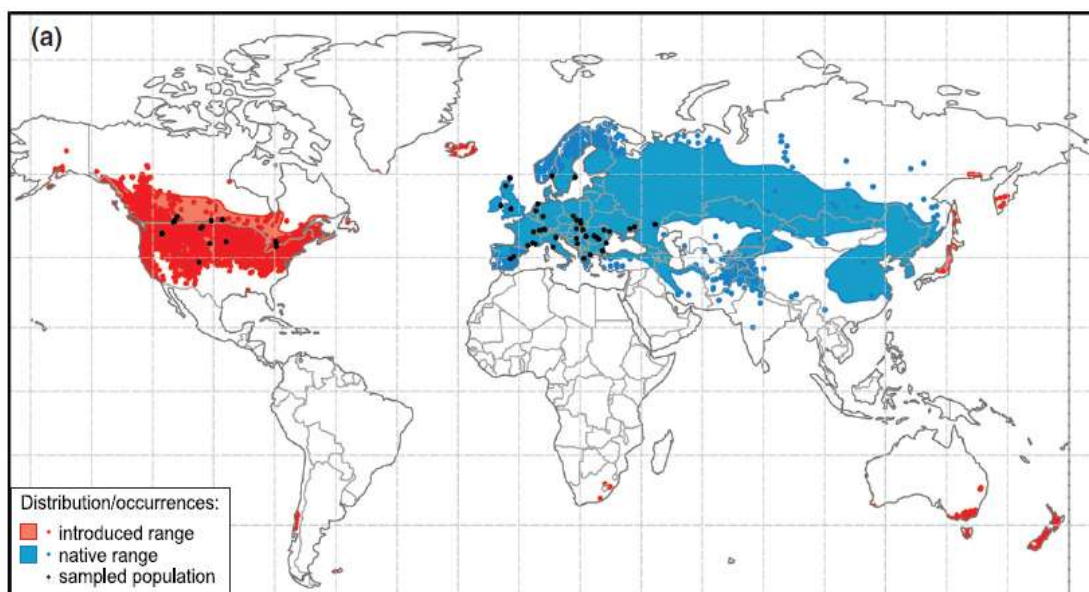
Pcháč je dvoudomá rostlina, vzdálenost mezi samčími a samičími rostlinami má vliv na produkci semen (Moore 1975). Kvete od června do září. Samčí úbory jsou oproti samičím větší a mají válcovitý zákrov. Menší samičí úbory mají vejcovitý až podlouhle vejcovitý zákrov, který se za plodu prodlužuje. Zákrovní listeny jsou nahoře fialově naběhlé, na vnější straně se slabě lepkavou střední ploškou, zakončené krátkým, měkkým ostnem (Bureš 2004). Květy mají růžovou trubkovitou korunu, část koruny je rozšířená a nepravidelně rozeklaná v čárkovité cípy, které dosahují až k bázi. Druh je považován za dvoudomý, ale vzácně byla u jedinců pozorována neúplná dvoudomost. U některých samčích rostlin byly v úboru vytvořeny klíčivé nažky (Bureš 2004; Tiley 2010). Samičí květy vydávají intenzivní medovou vůni, která hojně láká opylovače především včely

(Theis 2006). Plodem jsou 3-4 mm ochmýřené béžové až světle hnědé nažky, které mohou být roznášeny větrem na velké vzdálenosti (Bureš 2004). V jednom úboru bývá až 80 nažek, ale značná část je parazitovaná nebo nevyzrálá (Mikulka 2011).

Oset je přeborník v tvorbě diaspor. Rozmnožuje se vegetativně i generativně (Cripps et al. 2010). Má velice důmyslný a rozsáhlý kořenový systém, který je tvořen mohutnými svislými a vodorovnými kořenovými výběžky, na nichž jsou nepravidelně rozmístěné adventivními pupeny. Kořenové výběžky mají velkou regenerační schopnost (Mikulka 2011) uvádí schopnost regenerace z kořenového výběžku dlouhého 2 cm o průměru 3mm. Pcháče zvládnou přestát i velice suchá období díky horizontálním kořenovým výběžkům schopným prorůst až do hloubky několika metrů, protože mají velké nároky na vodu a živiny (Bureš 2004). Vegetativně se rozmnožují především v zemědělské půdě, kde poranění kořenů přispívá jejich rozmnožování. V přírodních podmínkách převažuje generativní způsob rozmnožování (Mikulka 2011).

1.2.1 Světové rozšíření *Cirsium arvense*

Areál rozšíření pcháče je v současné době velice rozlehlý. Původně se rostlina vyskytovala na severní polokouli starého světa v Evropě, Severní Africe, Malé a Střední Asii, Afghánistánu, Sibiři, Číně. Nyní má cirkumpolární rozšíření, nevyskytuje se pouze na Azorských ostrovech, Krétě, Špicberkách a Faerských ostrovech (Tiley 2010). Vlivem lidské migrace byl zavlečen i na ostatní kontinenty. Invazní výskyt je hlášen v Severní Americe, kam byl pravděpodobně zavlečen opakovaně na počátku 17. století francouzskými osadníky do Kanady a anglickými a holandskými osadníky do Nové Anglie (Moore 1975). K přenosu semen mohlo dojít spolu se zrnem, případně ve slámě v matracích, nebo jako součást pícnin. Guggisberg et al. (2012) ve své práci, zaměřené na porovnávání genotypů severoamerických pcháčů a původních evropských pcháčů, došli k závěru, že jsou na americkém kontinentě přítomny populace s genotypem podobným rostlinám ze západní i východní části Evropy. Zavlečení z východní Evropy mohlo proběhnout díky osadníkům z Ukrajiny, nebo velkou zásilkou obilí z Ruska, kde mohl být pcháč přítomen jako příměs (Guggisberg et al. 2012). Jako velmi rozsáhlý plevel je hlášen i v Austrálii, Novém Zélandu a vzácně i v Chile a na Falklandách (Amor and Harris 1974). Vizuální přehled o původním/nepůvodním rozšíření pcháče podává Obr. 1.



Obr. 1 Světové rozšíření pcháče osetu, červeně je zbarven nepůvodní areál rostliny, modře původní areál rostliny převzato z (Guggisberg et al. 2012)

1.2.2 Regulace *Cirsium arvense*

Boj s osetem je velice problematická záležitost, díky masivnímu kořenovému systému. Především v invazních areálech je nemalá část výzkumu zaměřena na boj s touto plevelnou rostlinou. Nabízí se několik možností počínaje mechanickou a chemickou likvidací, využívání konkurenčních rostlin až k použití herbivorů. Mladé rostliny, mohou být příležitostně spásány pasoucím se dobyt看em (Moore 1975), ale staré ostnité rostliny již nejsou dobyt看em vyhledávány, ostny zraňují zažívací ústrojí a kůži, která je pak náchylná k dalším infekcím (Urban and Šarapatka 2003). Proto se pozornost řady prací zaměřuje na hmyzí herbivory. Na pcháči se nachází velké množství hmyzu. Moore (1975) uvádí, na evropských rostlinách vyskyt až 86 druhů herbivorů. Pro příklad jsem vybrala motýla babočku bodlákovou (*Cynthia cardui*) jejíž housenky se živí listy. Jako výhodní v boji s pcháči se jeví nosatcovití brouci např. *Rhinocyllus conicus* (Cripps, Gassmann, et al. 2011). Problém nastává v nespecifickém útoku a napadání původních druhů severoamerických pcháčů (Louda, 1997). Další nosatcovitý brouk *Hadroplontus litura* byl zkoumán v Severní Americe, ale jeho vliv na regulaci pcháče nebyl nijak závratný (Burns, Prischmann-Voldseth, and Gramig 2013). Z hálkotvorného hmyzu např. vrtule bodláková *Urophora cardui*, larvy vrtule se vyvíjejí ve vzrostném vrcholu pcháče v místech diferenciací vodivých pletiv. Larva stimuluje rostlinu k tvorbě hálek, která je vyživována

na úkor ostatních rostlinných orgánů (Cripps, Gassmann, et al. 2011). Další duhy hmyzu se, vyvíjí v květenstvích, kde požírají květní lůžko a nažky např. *Xyphosia miliaria* (Skuhrovec, Mikulka, and Koprdoval 2008). Žíry na listech způsobují larvy štítonošů *Cassida rubiginosa* (Asadi et al. 2013; Bacher and Schwab 2000). Další formou biologické likvidace je využití houbových parazitů (*Puccinia punctiformis*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Septoria cirsii*), ty dráždí rostlinu k rychlému vývoji a tak nedojde k vykvetení (Bureš 2004; Cripps, Bourdôt, et al. 2011).

1.2.3 Sekundární metabolity v rodě *Cirsium*

Sekundární metabolity jsou látky, které nemají primární metabolické funkce (fotosyntéza, dýchání, fixace uhlíku) a liší se v distribuci napříč rostlinnou říší (Formisano et al. 2007). V pcháčích se vyskytuje řada sekundárních metabolitů, které mají fytoncidní, alelopatické účinky (Stachon and Zimdahl 1980), látky insekticidní a antimikrobní povahy (Harborne and Williams 2000). V rodě *Cirsium* sp. se vyskytují flavonoidy, fenolické kyseliny, taniny, steroly, triterpeny, polyacetyleny a acetyleny a v několika druzích i alkaloidy a lignany (Jordon-Thaden and Louda 2003; Nazaruk 2008).

Flavonoidy

Flavonoidy jsou jednou z největších skupin rostlinných fenolických látek. Jedná se o polyfenoly tvořené dvěma aromatickými cykly spojenými tříuhlíkovým můstkem. Jednotlivé skupiny flavonoidů (flavony, flavonoly, flavanony aj.) se liší substituenty navázanými na tento základní skelet (Taiz and Zeiger 1998). Jejich úloha v obraně rostlin je rozmanitá: mohou sloužit jako ochrana před UV zářením (Saleem et al. 2001), proti bakteriální infekci, obrana proti požeru hmyzem, hád'átky či savci (Harborne and Williams 2000). Mohou ovlivňovat chování, růst a vývoj hmyzu (Simmonds 2003). V některých případech však mohou flavonoidy sloužit i jako stimulant pro kladení vajíček, jako je tomu například u *Danaus plexippus* (Harborne and Williams 2000). Flavonoidy jsou považovány za nejhojněji zastoupenou skupinu sekundárních metabolitů v pcháčích, např. Jordon-Thaden and Louda (2003) uvádí okolo 78 detekovaných flavonoidů. Mezi nejčastěji sledované flavonoidy patří apigenin, linarin (Lu et al. 2009; Nalewajko-Sieliwoniuk et al. 2012; Sun et al. 2012), cirsimaritin, pectolinarin (Jeong et al. 2008) kaempferol, kvercetin (Sun et al. 2012), luteolin, rutin (Lu et al. 2009; Sun et al. 2012),

tricin, hispidulin, akacetin, syringin naringenin (Sun et al. 2012) a rozmanité glykosidy těchto látek.

Steroly a triterpeny

Účinky těchto látek bývají spojovány s insekticidním působením na hmyz. Některé mají antagonistický vliv na svlékání larev (Jordon-Thaden and Louda 2003). Jsou druhy hmyzu, které steroly využívají jako zdroj cholesterolu. V pcháčích bývá přítomný například β -sitosterol, amyirin (Marga et al. 2001) taraxasterol, taraxasterol acetat (lupeol), campesterol (Formisano et al. 2007; Theis, Lerda, and Raguso 2007; Theis and Raguso 2005).

Fenolické kyseliny

Tyto látky se běžně vyskytují v rostlinách, kde se podílí na řadě fyziologických funkcí, např. stimulace růstu rostliny, bakteriostatické a fungicidní účinky (Kozyra and Głowniak 2013). Podobně jako flavonoidy mohou mít vliv na chování hmyzu. Mohou působit odpudivě a snižovat potravní atraktivitu rostliny (Jordon-Thaden and Louda 2003). V literatuře je uváděna přítomnost p-kumarové kyseliny, kávové kyseliny, ferulové kyseliny, vanilové kyseliny, p-hydroxybenzoové kyseliny, 3,4-dihydroxybenzoové kyseliny, syringové kyseliny, chlorogenové kyseliny, galové kyseliny (Kenny et al. 2014), rozmarýnové kyseliny, gentisové kyseliny (Kozyra and Głowniak 2013), salicylové a skořicové kyseliny (Chon, Kim, and Lee 2003).

Polyacetyleny

Polyacetyleny se typicky vyskytují v kořenech rostlin čeledi *Asteraceae* (Jordon-Thaden and Louda 2003). Jedná se o látky, které jsou ve většině případů, toxické pro hmyz a savce (Bureš 2004; Formisano et al. 2007). V pcháčích byla popsána přítomnost acetylen alkoholu, aplotaxenu, triolacetylenu, vinylpentaacetylenu (Jordon-Thaden and Louda 2003).

Alkaloidy

Alkaloidy jsou heterogenní skupina obsahující dusík. Fungují jako chemická obrana proti býložravcům, patogenům i jako alelopatické látky proti ostatním rostlinným konkurentům. V pcháčích je popisován výskyt O-acetyljakolinu v *Cirsium wallichii* a heliotridanu v *Cirsium steigerum* (Jordon-Thaden and Louda 2003).

1.3 Sekundární metabolity v *Cirsium arvense*

Na základě údajů nalezených v literatuře byly v pcháčích identifikovány následující látky (viz Tab. 1.):

Tab. 1: Seznam sekundárních látek v *Cirsium arvense*

Skupina	chemické látky	Citace
flavonoidy	apigenin, luteolin, narirutin, rutin, linarin akacetin, cirsimaritin, kaempferol, isokaempferid, rutin, syringin, astragalin, pectolinarigen apigenin-7-glukosid luteolin-7 -glukosid apigenin-7-rhamnoglucosid kaempferol-3-O-galaktosa kvercetin-3-O-digalaktosid kvercetin-3-O- β -D-galaktopyranosid kvercetin-3-O- β -D-glukopyranosid kvercetin-3-O-rhamnoglukosid tricin-5-O-glukosid	Kenny et al. (2014) Jordon-Thaden and Louda (2003)
steroly triterpeny	Taraxasterol, Taraxasterol acetát	Jordon-Thaden and Louda (2003)
polyacetyleny	Tridecylpolyacetylen, aploaxen, 1- pentadecen, triolacetylen 1-heptadecen 1,8,11-heptadekatrien	Jordon-Thaden and Louda (2003)
fenolické kyseliny	p-kumarová, kávová, chlorogenová, galová, ferulová, vanilová, chinová, p-hydroxybenzoová, syringová, 3,4-dihydroxybenzoová	Jordon-Thaden and Louda (2003); O. Kenny et al. (2014)

Pro potřeby lidového léčitelství se používají kořeny osetu jako diuretikum a mladé listy a kořeny k přípravě nálevů s adstringentním a protizánětlivým účinkem (O. Kenny et al. 2014; Nazaruk 2008).

2 Cíle práce

V této práci jsem se snažila zjistit, jak se od sebe liší v obsahu sekundárních metabolitů pcháč oset ze dvou areálů výskytu rostliny: z invazního areálu v Severní Americe, který zastupují vzorky z Illinois a Nebrasky, a z původního evropského areálu zastoupeného vzorky z České republiky a Španělska. Práce navazuje na již uskutečněný zahradní experiment, který v letech 2007-2010 provedla Inés Abela Hofbauerová. Z tohoto experimentu byly získány listy sklizených rostlin a z nich připraveny methanoloové extrakty.

Tento cíl se snažím naplnit prostřednictvím zodpovězení následujících otázek.

1. Které fenolické kyseliny a flavonoidy jsou zastoupeny v extraktech z listů pcháče osetu?
2. V jakém množství jsou fenolické kyseliny a flavonoidy přítomny v metanoloových extraktech?
3. Jsou rozdíly v množstvích sekundárních látek v rostlinách v invazním a původním areálu, z něhož rostliny pochází?
4. Existují rozdíly v množství sekundárních látek v jednotlivých státech (Česká republika, Španělsko, Nebraska, Illinois)?

3 Metodika

3.1 Zdroj rostlinného materiálu

V mé práci byly použity listy pcháče osetu (*Cirsium arvense*), které byly získány ze zahradního experimentu provedeného v letech 2007-2010. Tento pokus je podrobně popsán v práci (Abela-Hofbauerová and Münzbergová 2011).

3.1.1 Místa odběru mateřských rostlin

Pro potřeby zahradního experimentu byly v červnu, červenci a srpnu 2007 odebrány mateřské rostliny *Cirsium arvense* ve svém původním areálu (Evropa) a invazním areálu (Severní Amerika). Invazní a původní prostředí byly od sebe vzdáleny 7 900 km. V invazním areálu byly rostliny získány v Nebrasce a Illinois, v původním areálu ve Španělsku a České republice. Všechna odběrová místa měla podobu opuštěných polí v zemědělské krajině. Podrobnější informace o odběrových lokalitách podává Tab. 2. Z každé země bylo odebráno 5 mateřských rostlin, vybraných pokud možno z rozdílných populací.

Tab. 2: Informace o umístění a klimatu, ze kterých byly odebrány vzorky semen pro experiment (převzato z Abela-Hofbauerová and Münzbergová 2011)

areál	populace	zeměpisná šířka/délka	nadmořská výška (m)	klima
původní	Španělsko	N41°29'40'' E1°19'27''	703	krátké mírné zimy, dlouhá horká suchá léta středomořské/vnitrozemské kontinentální klima
	Česká republika	N49°51'06'' E14°12'37''	460	dlouhé, chladné zimy, krátká léta, kontinentální klima
invazní	Nebraska	N40°54'00'' W96°23'13''	338	studené zimy, dlouhá horká léta, vlhké kontinentální klima
	Illinois	N41°19'16'' W89°55'59''	237	studené zimy, dlouhá horká léta, vlhké kontinentální klima

3.1.2 Zahradní experiment

V dubnu 2008 byly sazenice osázeny do společné zahrady v České republice. Sazenice nemohly být umístěny přímo do půdy. Proto byly zasazeny do rozměrných

květináčů vyrobených ze dvou plastových pytlů o velikosti (100 cm dlouhý x 75 cm v průměru x 2 mm tlustý). Květináče byly naplněny 50 l substrátu. Na dně každého byl vytvořen otvor o velikosti 0,5 x 0,5 cm, aby se zabránilo nadměrné vlhkosti půdy. Byly použity dva typy substrátu pro studium vlivu půdních podmínek na rostlinný růst. Jako substrát chudý na živiny se použil písek z lomu vzdáleného 100 km od experimentálního místa. V případě substrátu bohatého na živiny se použila půda z blízké zahrady. Nejnížší třetina každého pytle byla naplněna šterkem (1cm v průměru) pro zajištění odvodnění. Vzhledem k velkému množství substrátu nebylo možné celý objem sterilizovat proto, byla na vrchu substrátu umístěna směs sterilizovaného písku a perlitu v poměru 10:1, která měla zabráňovat klíčení plevelů. Ihned po výsadbě sazenic byly nad každou rostlinu umístěny válcové kovové konstrukce (39 cm v průměru a 98 cm vysoké), přes které byly umístěny bílé průsvitné polyamidové pytle a připevněny k vnější straně pytle. Toto ošetření mělo zabránit napadení rostlin přirozenými škůdci. Během května 2010 byly experimentální rostliny sklizeny. V rámci sklizení rostlin byly pro účely této práce odebrány i listy. Konkrétně byly odebrány plně vyvinuté listy z horní části rostliny, tak aby byly všechny listy přibližně stejně staré. Odebrané listy byly zamrazeny při teplotě - 80°C a připraveny k extrakci.

3.2 Extrakce listů (*Cirsium arvense*)

Extrakce listů pcháče osetu (*Cirsium arvense*) byla provedena v laboratoři biotechnologie rostlin UEB AV ČR v. v. i. následujícím postupem.

Použité chemikálie

- Metanol pro HPLC (LAB-SCAN, Polsko)
- kapalný dusík
- diethyleter, p.a (Penta, ČR)
- 5-fluorosalicylová kyselina 97% (SIGMA-ALDRICH, ČR)
- BHT (2,6-di-tert-butyl-p-cresol) (SIGMA-ALDRICH, ČR)
- deionizovaná voda pro HPLC, (Sci-Aqua, SISW, ČR)

Použitá zařízení

- ultrazvuková lázeň (BANDELIN SONOREX, Německo)
- rotační třepačka
- vakuová odparka (BÜCHI ROTAVAPOR R-114, Švýcarsko)
- centrifuga (Zentrifugen Hettich- Universal 32R, Německo)

Postup extrakce

Listy byly homogenizovány ve třecí misce v kapalném dusíku. Bylo naváženo 0,5 g homogenizovaných listů a převedeno do zkumavky a extrahováno 7 ml 80% metanolu s přidavkem 100 µl antioxidantu BHT. Zkumavka se vzorkem byla na 5 minut ponořena do ultrazvukové lázně, na 30 minut do rotační třepačky a 10 minut centrifugována při 4000 rpm. Takto byl vzorek extrahován třikrát za sebou. Po každém cyklu byla tekutá fáze odebrána do odpařovací baňky. Po odebrání poslední třetí tekuté fáze do odpařovací baňky byly slité extrakce odpařeny na vakuové odparce při 35 °C ve vodní lázni.

Odparek byl rozpuštěn v 6 ml deionizované vody a hodnota pH roztoku byla upravena přidáním HCl na pH = 2. K roztoku bylo přidáno 250 µl roztoku (1 mg/ml) vnitřního standardu kyseliny 5-fluorosalicylvé o finální koncentraci 40 µg/ml. Vzorek byl extrahován třikrát po sobě 6 ml dietyleru. Extrakce byla prováděna ve skleněné zkumavce se šroubovacím víčkem. Vzorek byl 1 h protřepáván na rotační třepačce a následně 3 minuty centrifugován při 4000 rpm. Oddělená horní dietylerová vrstva byla odebrána do odpařovací baňky. Všechny tři slité frakce byly odpařeny na vakuové odparce při 30°C na vodní lázni.

Po odpaření byl vzorek znovu rozpuštěn v dietyleru třikrát po 500 µl a převeden do 1,5 ml vialky a odpařen proudem dusíku do sucha. Vzorky byly uskladněny při teplotě - 80°C až do analýzy.

Tímto způsobem bylo připraveno 19 vzorků ve třech až pěti opakováních v závislosti na množství dostupných listů z pokusné rostliny. Z pěti rostlin z Illinois bylo připraveno pět vzorků, stejně tak tomu bylo u přípravy vzorků z rostlin z Nebrasky a České republiky. U rostlin ze Španělska, byly připraveny jen čtyři vzorky.

3.3 Analýza extraktů z listů (*Cirsium arvense*)

Analýzy extraktů jsem prováděla v laboratoři biotechnologie rostlin UEB AV ČR, v. v. i. kde jsem HPLC analýzou kvalifikovala a kvantifikovala přítomné fenolické látky v extraktech z listů rostlin *Cirsium arvense*

Pomůcky a přístroje

- laboratorní sklo (kádinky, odměrné válce 5000 ml; 10 ml; vialky 1,5 ml; inserty)
- analytické váhy (BOECO, Německo)
- míchačka (Classic-Vortex Mixer, Velp Scientifica Lab Solutions, Itálie)
- ultrazvuková lázeň (BANDELIN SONOREX, Německo)
- pipeta 100; 200; 1000 µl (Eppendorf Reference, Německo)
-

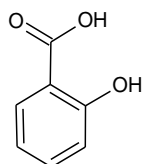
HPLC s PDA detekcí

- autosampler (Midas, Spark, Nizozemí)
- termostat (Mistral, Spark, Nizozemí)
- kolona s předklonkou - Kinetex™ 2.6 µm PFP 100 A, 150 x 4.6 mm (Phenomenex, USA)
- pumpa (Q-Grad, Watrex, ČR)
- detektor - SpectraSystem, UV 6000 LP, (Thermo Finnigan, USA)

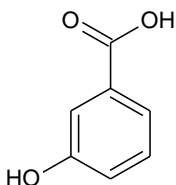
Chemikálie

- metanol pro HPLC (LAB-SCAN, Polsko)
- deionizovaná voda pro HPLC, (Sci-Aqua, SISW, ČR)
- kyselina octová ledová 99,8% (Penta, ČR)
- acetonitril pro HPLC p. a (Penta, ČR)
- standardy: Chemickou strukturu použitých standardů ukazuje obrázky 1-30.

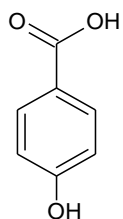
standardy:	výrobce:
m- hydroxybenzoová kyselina 99%	Aldrich chemismy, SIGMA- ALDRICH, ČR
3,4- dihydroxybenzoová kyselina 99 %	Aldrich chemismy, SIGMA- ALDRICH, ČR
4-metoxybenzoová kyselina (anýzová) 99 %	Aldrich chemismy, SIGMA- ALDRICH, ČR
5- fluorosalicylová kyselina 97%	Aldrich chemismy, SIGMA- ALDRICH, ČR
ferulová kyselina 99 %	Aldrich chemismy, SIGMA- ALDRICH, ČR
galová kyselina	Fluka, SIGMA- ALDRICH, ČR
chlorogenová kyselina	HWI ANALYTIK GMBH
kávová kyselina	Sigma life Science, SIGMA- ALDRICH, ČR
p- hydroxybenzoová kyselina 99%	Aldrich chemismy, SIGMA- ALDRICH, ČR
salicylová kyselina	SIGMA, ČR
sinapová kyselina	Fluka, USA
trans- skořicová kyselina 99 %	Aldrich chemismy, SIGMA- ALDRICH, ČR
syringová kyselina	SIGMA, ČR
vanilová kyselina	Fluka analytical, ČR
epigallokatechin	Aldrich chemismy, SIGMA- ALDRICH, ČR
(-)- epikatechin	Aldrich chemismy, SIGMA- ALDRICH, ČR
kvercetin	SIGMA. ČR
kaempferol	Sigma life Science, SIGMA- ALDRICH, ČR
luteolin	Sigma life Science, SIGMA- ALDRICH, ČR
luteolin-7- glukosid 98%	Fluka, SIGMA- ALDRICH, ČR
myricetin	Fluka, SIGMA- ALDRICH, ČR
myricitrin	SIGMA- ALDRICH, ČR
(+)-naringenin	Fluka analytical, SIGMA- ALDRICH, ČR
naringin	Sigma life Science, SIGMA- ALDRICH, ČR
rutin	Carl Roth GmbH&Co, Německo
taxifolin	Fluka, SIGMA- ALDRICH, ČR
katechin	Fluka analytical, SIGMA- ALDRICH, ČR
p-kumarová kyselina 98%	SIGMA, ČR
apigenin	SIGMA- ALDRICH, ČR



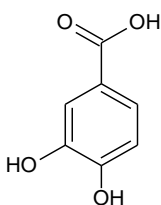
1) salicylová kyselina



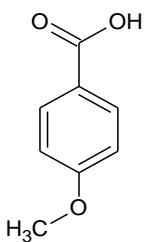
2) m- hydroxybenzoová kyselina



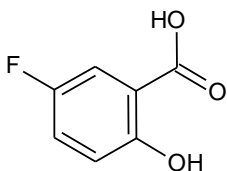
3) p- hydroxybenzoová kyselina



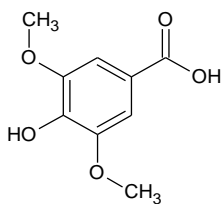
4) 3,4-dihydroxybenzoová kyselina



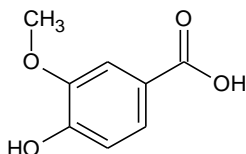
5) 4- methoxybenzoová (anýzová) kyselina.



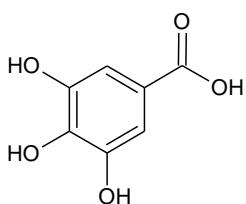
6) 5-fluorosaliclová kyselina



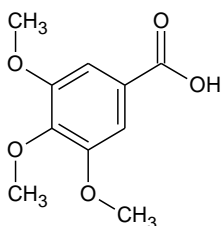
7) syringová kyselina



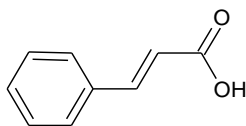
8) vanilová kyselina



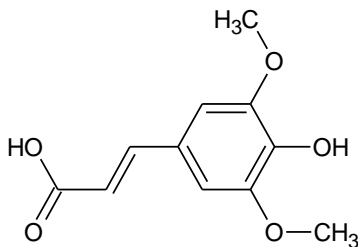
9) galová kyselina



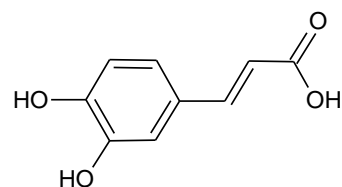
10) 3,4,5-trimethoxybenzoová kyselina



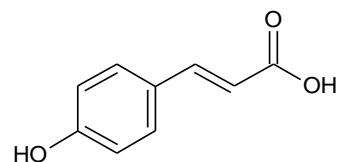
11) trans-skořicová kyselina



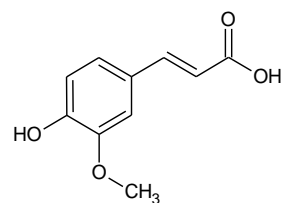
12) sinapová kyselina



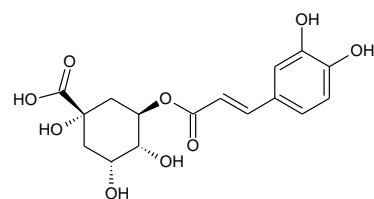
13) kávová kyselina



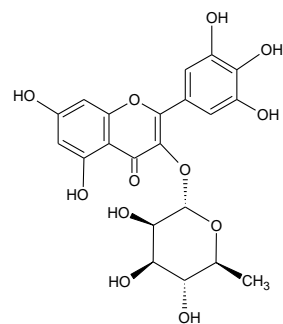
14) p-kumarová kyselina



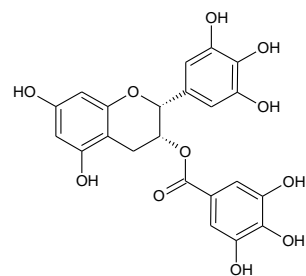
15) ferulová kyselina



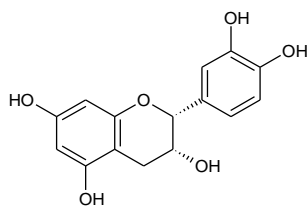
16) chlorogenová kyselina



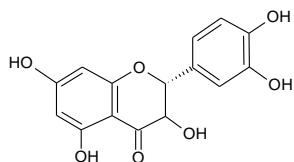
17) myricitrin



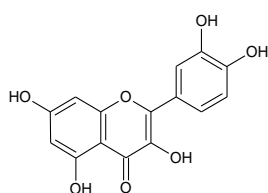
18) epigallokatechin galát



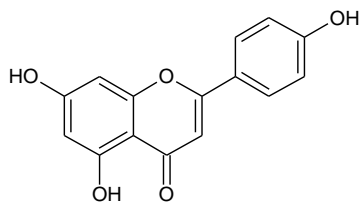
19) epikatechin



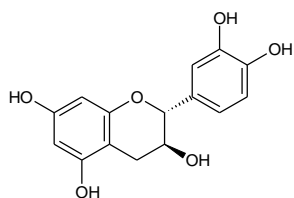
20) taxifolin



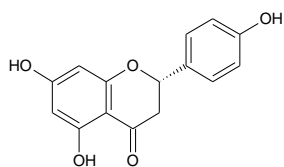
21) kvercetin



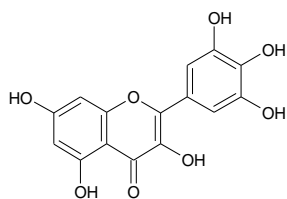
22) apigenin



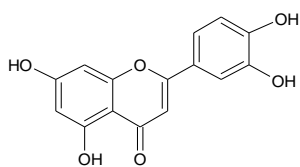
23) (+)-catechin



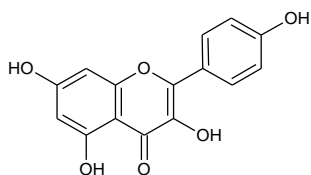
24) naringenin



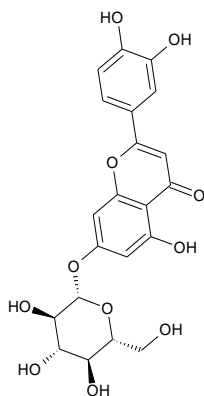
25) myricetin



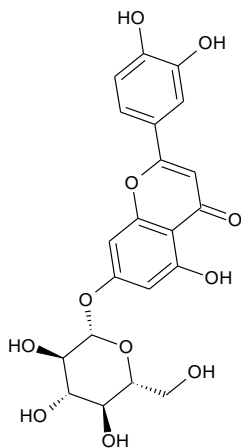
26) luteolin



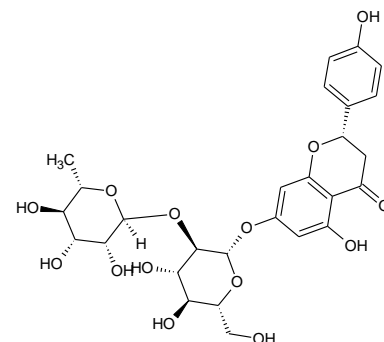
27) kaempferol



28) rutin



29) luteolin- 7-glukosid



30) naringin

3.3.1 Příprava standardů

Roztoky standardů fenolických látek jsem připravila rozpuštěním 1 mg standardu v 900 µl čistého metanolu. Výjimkou byl apigenin, který se v methanolu velice špatně rozpouštěl a proto byl methanol v tomto případě nahrazen etanolem. Flavonoidy (apigenin, luteolin-7- glukosid), které se obtížněji rozpouštěly, jsem ponořila do ultrazvukové lázně. Z třiceti zásobních roztoků standardů jsem odebrala po 33 µl standardu a napipetovala do 1,5 ml vialky. Takto jsem připravila 1 ml směsi o koncentraci 33 µl/ml.

3.3.2 Příprava kalibrační řady standardů

Vzhledem k množství vybraných standardů fenolických látek by jejich jednotlivé měření zabralo neadekvátní množství času. Proto jsem fenolické látky pro sestavení kalibračních křivek standardů měřila v několika skupinách (viz Tab. 3).

Fenolické látky byly do jednotlivých skupin zařazeny podle retenčních časů tak, aby se retenční časy nacházely pokud možno co nejdále od sebe a nedocházelo tak k překrývání signálů analyzovaných látek.

Pro každou skupinu jsem vytvořila zásobní roztok vybraných fenolických látek, který jsem následně ředila metanolem. Takto jsem připravila koncentrační řadu 1 ml roztoků o koncentracích 0,1; 0,5; 1; 2; 5; 10; 20; 25; 50; 100 µg/ml. Připravené kalibrační roztoky standardů byly na kolonu nastříkovány v objemu 5 µl.

Z naměřených hodnot byla pro každou fenolickou látku sestavena desetibodová kalibrační křivka, kterou jsem použila ke kvantifikaci fenolických kyselin a flavonoidů.

Tab. 3 Rozdělení standardů do skupin pro přípravu kalibračních řad

	A	B	C	D	E
Fenolické látky	kumarová k. 3,4- dihydroxybenzoová k. galová k. p- hydroxybenzoová k. m- hydroxybenzoová k salicylová k. syngová k. rutin vanilová k. naringin	chlorogenová k kávová k. ferulová. sinapová k. luteolin-7- glukosid anisová k. myricetin luteolin naringenin kaempferol	fluorosalicylvá k. trans skořicová k. taxifolin kvercetin epikatechin myricitrin epigallokatechin gallate 3,4,5- trimetoxybenzoová k.	myricetin luteolin	apigenin

3.3.3 Příprava analyzovaných vzorků

Pro analýzu jsem od každého vzorku vybrala první extrakci z listů, ale u vzorku L F1_35 z Nebrasky jsem analyzovala čtyři extrakce téhož vzorku a u vzorku L- F1_18 z Illinois tři extrakce téhož vzorku, abych mohla posoudit variabilitu v rámci jednoho vzorku. Celkem bylo vybráno k analýze čtyřiatdvacet vzorků.

Ke každému extraktu z listů, které byly do doby analýzy uskladněny při teplotě -80°C jsem napipetovala 100 µl metanolu. Vzorky byly poté míchány pomocí Vortexu do jejich úplného rozpuštění. Rozpuštěný extrakt jsem poté přepipetovala do insertu a vrátila zpět do původní vialky. Pro zamezení odparu rozpouštědla ze vzorku v insertu a tím i změny jeho koncentrace jsem do vialky napipetovala 100 µl metanolu.

3.3.4 Kvalitativní a kvantitativní HPLC analýza

Směs standardů, kalibrační roztoky a vzorky extraktů jsem analyzovala pomocí HPLC metody s následujícími parametry:

Mobilní fáze pro HPLC byla složena z polární fáze (A) - 0,5% objemových kyseliny octové v deionizované vodě a nepolární fáze (B) - 0,5% objemových kyseliny octové v acetonitrilu. Průtok mobilní fáze byl 1 ml/min. Kolona byla temperována na teplotu 35 °C. Vzorky byly na kolonu nastříkovány ve dvou měřených objemech 5 µl a 10 µl. Analýza probíhala gradientovou elucí (Tab. 4) po dobu 52 min. Analyty byly detekovány dipólovým PDA detektorem při vlnové délce 260 a 300 nm.

Všechny analyzované vzorky jsem měřila v sekvenci, po každém pátém vzorku bylo měření proloženo měřením směsi standardů, která byla na kolonu nastříkována v objemu 5 µl. Směs standardů byla měřena, aby bylo možné eliminovat posuny retenčních časů fenolických látek v průběhu měření.

Tab. 4: Gradient mobilní fáze: A - polární fáze 0,5% roztok kyseliny octové ve vodě; B-nepolární fáze- 0,5% kyseliny octové v acetonitrilu

Čas [min]	0	10	14	25	30	34	38	48	51	61
A (%)	96	85	79	78	72	59	0	0	96	96
B (%)	4	15	21	22	28	41	100	100	4	4

Kvalitativní analýzu a identifikaci látek ve vzorcích jsem prováděla v programu EZ-Chrom Elite (ThermoFinnigan, USA). Porovnávala jsem naměřené hodnoty absorpčních spekter a retenčních časů s hodnotami standardů v předem vytvořené knihovně.

Kvantitativní analýzu fenolických látek jsem provedla metodou vnějších standardů v programu CLARITY (Data Apex, ČR) porovnáváním ploch píků fenolických látek a výpočtem z regresní rovnice kalibračních křivek, které až na flavonoid myricetin měly podobu lineární regrese. V případě myricetinu jsem použila regresi polynomickou.

Naměřené koncentrace [$\mu\text{g/ml}$] fenolických látek v methanolových extraktech jsem přepočítala na koncentraci látek [$\mu\text{g/g}$] v 0,5g listů.

3.3.5 Výběr dat pro statistickou analýzu

Analýzou HPLC jsem získala data o koncentracích fenolických látek ve 24 vzorcích pro nastříkovaný objem 5 a 10 μl detekovaný při vlnových délkách 260 nm (A) a 300 nm (B). Pro statistické zpracování jsem data sloučila do jedné tabulky. Na základě porovnání chromatogramů jsem vybírala ty hodnoty, při kterých měli fenolické látky nejlépe čitelná absorpční spektra. Z analýzy byla vyloučena kyselina 5-fluorosalicyllová, která byla do vzorků přidávána jako vnitřní standard, a kyselina m-hydroxybenzoová, která se vyskytovala pouze v jediném vzorku. U vzorků, které byly měřeny opakovaně, jsem získané hodnoty zprůměrovala a dále pracovala s průměrnou hodnotou.

3.4 Statistická analýza

Získaná data jsem podrobila mnohorozměrné statistické analýze v programu CANOCO 5. Směr variability fenolických látek jsem zkoumala nepřímou lineární ordinací PCA (analýzou hlavních komponent) ve dvou krocích. V prvním kroku jsem provedla nepřímou lineární ordinaci PCA se standardizací přes druhy. V druhém kroku jsem provedla nepřímou lineární ordinaci PCA standardizovanou před druhy a vzorky. Vztah mezi koncentracemi fenolických látek jako závislé proměnné a areálem jako proměnnou prostředí jsem testovala přímou lineární analýzou RDA ve dvou krocích. V prvním kroku byly vzorky standardizovány přes druhy. V druhém kroku byly vzorky standardizovány přes druhy i vzorky. Vztah mezi koncentracemi fenolických látek jako závislou proměnnou a státem výskytu rostliny jako proměnnou prostředí jsem testovala přímou lineární

analýzou RDA ve dvou krocích. V prvním kroku byly vzorky standardizovány přes druhy. V druhém kroku byly vzorky standardizovány přes druhy i vzorky. V permutačním testu jsem použila všechny proměnné prostředí proti všem hodnotám fenolických látek ve vzorku.

Dále jsem data analyzovala jednorozměrnou analýzou v programu Statsoft Statistika v 7.0.61.0. Neparametrickou analýzou variance jsem zkoumala závislost jednotlivých fenolických látek jak na areálu (původní/ invazní), tak na státu, ze kterého pocházela mateřská rostlina

4 Výsledky

4.1 HPLC analýza fenolických látek

V této práci jsem metodou HPLC analyzovala devatenáct vzorků, připravených extrakcí listů rostlin *Cirsium arvense* v metanolu. Rostliny byly vypěstovány v České republice v Průhonicích. Semena pro výsev rostlin byla obstarána z mateřských rostlin ze dvou států invazního areálu (Nebrasky a Illinois) a ze dvou států původního areálu (České republiky a Španělska).

Sada analyzovaných vzorků byla pro každý stát tvořena 5 vzorky, výjimku tvořily vzorky ze Španělska, kde bylo o jeden vzorek méně. V pcháčích jsem dohromady detekovala přítomnost jedenácti fenolických kyselin: 3,4-dihydroxybenzoová, p-hydroxybenzoová, m-hydroxybenzoová, chlorogenová, vanilová, kávová, syringová, kumarová, ferulová, sinapová a salicylová kyselina a tři flavonoidů: luteolin, kaempferol, apigenin. Zastoupení fenolických látek a jejich koncentrace se napříč vzorky lišila. Jako příklad přikládám chromatogram vzorku z Illinois (Obr. 3).

Kvantitativní složení vzorků bylo vyhodnocováno metodou vnějšího standardu. Hodnoty koncentrace fenolických látek byly vypočítány z plochy píků, regresními rovnicemi, které jsou uvedené v Tab. 5. Chromatogram standardů představuje Obr. 2.

Kvantitativní zastoupení fenolických látek ve vzorcích shrnuje souhrnná tabulka Tab. 6). Ve všech vzorcích jsem detekovala přítomnost kyseliny p-hydroxybenzoové, vanilové, kumarové a ferulové a flavonoidu apigeninu. Nutno podotknout, že vzorky ze Španělska obsahovaly, až na jeden vzorek, pouze stopová množství kyseliny ferulové. Téměř ve všech vzorcích se vyskytovala i kyselina 3,4-dihydroxybenzoová, chlorogenová, syringová a flavonoid kaempferol. Kyselina salicylová se vyskytovala ve všech vzorcích rostlin z Illinois a Španělska, ale jen v některých vzorcích z Nebrasky a České republiky. Kyselina kávová byla přítomna téměř ve všech vzorcích v podobných koncentracích až na vzorky ze Španělska, kde nebyla detekována ani v jediném. Luteolin byl analyzován pouze ve dvou vzorcích z České republiky a třech vzorcích z Illinois. Ve dvou vzorcích z České republiky byla ve velmi nízké koncentraci detekována kyselina sinapová. Kyselina m-hydroxybenzoová byla detekována v jednom případě vzorku ze Španělska. Je pravděpodobné, že všechny zmíněné fenolické látky se mohly vyskytovat ve všech vzorcích, ale jejich koncentrace byla tak malá, že jejich odezva se nacházela pod hranicí

detekce. Zbývajících šestnáct látek, pro které byly sestaveny kalibrační křivky (kyselina galová; skořicová; anýzová; 3,4,5-trimethoxybenzoová kyselina; rutin; luteolin-7-glucosid; myricetin; naringin; naringenin; taxifolin, kvercetin, (+)-katechin; epikatechin; myricitrin a epigallokatechin galát) jsme ve vzorcích nedetekovala.

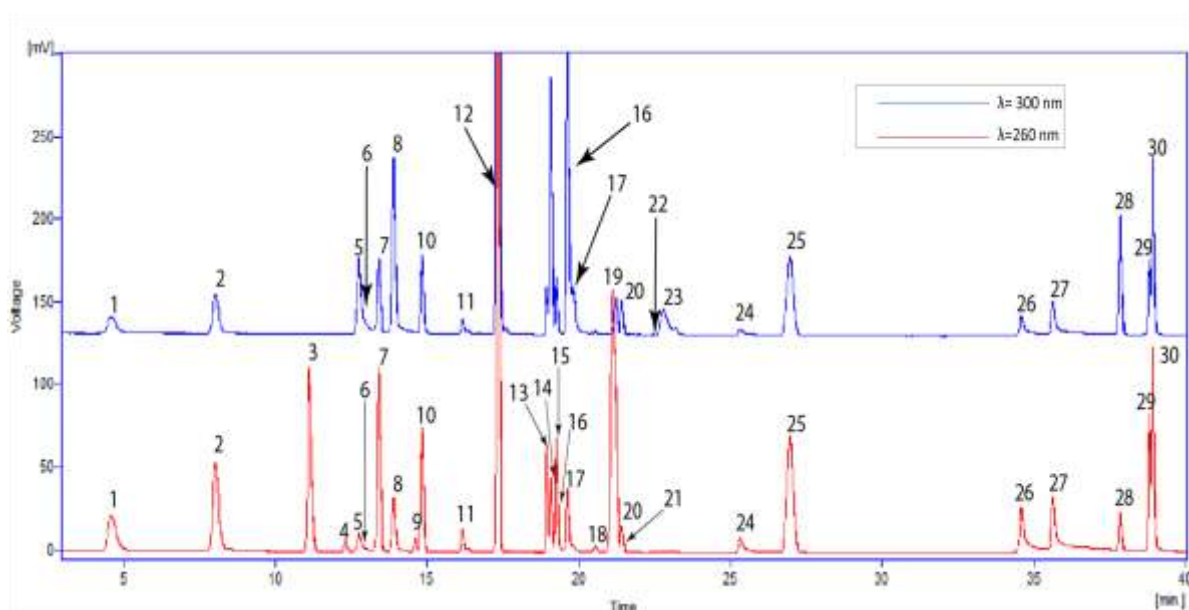
Tab. 5: Standardy - retenční čas, vlnová délka absorpčního maxima, regresní rovnice, korelační koeficienty

Standard	Retenční čas [min]	Absorpční maximum λ [nm]	Regresní rovnice	R^2
gallová k.	4,606	271	$y=10,65454x-0,61418$	0,9999759
3,4- dihydroxybenzoová k.	8,034	293	$y=20,26164x$	0,9999707
p-hydroxybenzoová k.	11,122	254	$y=27,92192x$	0,9998306
katechin	12,344	277	$y=0,99779x-0,72106$	0,9995977
m-hydroxybenzoová k.	12,776	298	$y=0,92374x$	0,9998306
chlorogenová k.	13,1	326	$y=2,02477x-8,67497$	0,9988664
vanilová k.	13,425	291	$y=22,6499x$	0,9998534
káвовá k.	13,908	323	$y=6,24408x-5,31777$	0,9996358
epikatechin	14,633	278	$y=1,19679x-0,9921$	0,9998304
syringová k.	14,850	275	$y=12,31148x$	0,9999255
epigallokatechin gallat	16,184	275	$y=3,0363x-7,82314$	0,9984677
p-kumarová k.	17,326	308	$y=7,28066x$	0,9998185
rutin	18,970	354	$y=8,23121x$	0,9998481
ferulová k.	19,103	323	$y=6,37858x+3,93523$	0,999852
myricitrin	19,269	349	$y=10,33016x-12,94671$	0,9994516
sinapová k.	19,649	321	$y=3,58095x$	0,999681
salicylová k.	19,812	300	$y=0,566643x$	0,9995643
luteolin-7-glukosid	20,574	349	$y=3,98824x-1,18835$	0,9997078
4-metoxybenzoová k.	21,23	255	$y=33,36884x+23,2053$	0,9997478
naringin	21,449	325	$y=3,00294x+1,01414$	0,9999423
taxifolin	21,742	289	$y=2,08199x-7,03387$	0,9987038
3,4,5-trimethoxybenzoová k.	22,461	263	$y=14,04255x+0,04824$	0,9999797
5-fluorosalicylová k.	22,820	307	$y=0,3386x+4,75854$	0,9861591
myricetin	25,353	371	$y=0,03483x^2+1,95004x-5,201139$	0,9999408
trans-skořicová k.	26,983	277	$y=27,21666x+1,04776$	0,9997951
kvercetin	34,615	370	$y=13,96616x-71,97983$	0,9970185
luteolin	35,653	347	$y=9,23308x-33,87634$	0,9977125
naringenin	37,853	288	$y=3,864x+4,32503$	0,9996557
kaempferol	38,821	366	$y=13,48798x-0,25132$	0,9997575
apigenin	38,948	337	$y=16,24888x+0,44624$	0,9999919

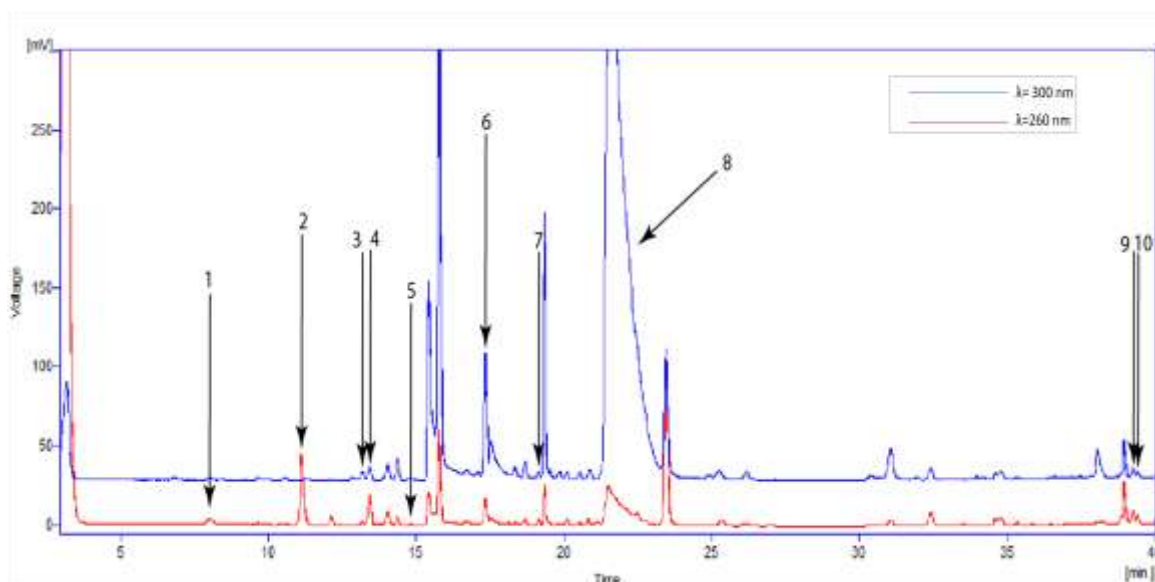
R^2 – korelační koeficient; λ – vlnová délka; y – plocha píku

Tab. 6: Souhrnná tabulka: Vybrané koncentrace (fenolických kyselin a flavonoidů) v [µg/g] měřené při vybrané vlnové délce A (260 nm) nebo B (300 nm), podle čitelnosti absorpčního spektra látek. **St-** označuje stopové množství.

areál	stát	vzorek	3,4-dihydroxy benzoová	p-hydroxy benzoová	m- hydroxy benzoová	chlorogenová	vanilová	káвовá	syringová	kumarová	ferulová	sinapová	salicylová	luteolin	kaempferol	apigenin
INVAZINÍ	ILLINOIS	L-F1 18.	0,4441	3,8197	0	2,3615	1,4034	0,2674	0,0264	8,6399	0,4239	0	0,4770	0,4369	0,0872	0,2620
		L-F1 19.	0,359	1,6912	0	1,642	0,7818	0,1668	0,1122	0,6924	0,0798	0	0,1710	0	0,1150	1,1523
		L-F1 20.	0,3656	3,2812	0	2,8736	0,6666	0,1813	0,0543	3,7826	0,3792	0	0,6955	0	0,0096	0,2525
		L-F1 21.	0,2312	0,9102	0	1,8268	0,4462	0,1281	0,0394	1,4444	0,0698	0	0,2945	0	0,1255	0,0685
		L-F1 22	0,3822	2,6192	0	1,687	1,1088	0	0,0922	2,3512	0,3644	0	0,7538	0,3136	0,2885	2,0087
	NEBRASKA	L-F1 32	0,7458	3,3734	0	1,202	2,6266	0,2646	0,1356	5,952	1,1224	0	0,7220	0	0,2025	0,2282
		L-F1 33	0,7324	2,4922	0	3,5536	2,5388	0,4782	0,1621	3,517	0,8494	0	0,5186	0	0,2371	5,3582
		L-F1 34	0	0,0966	0	0,8784	0,1284	0	0	0,0588	st	0	0	0	0,0175	0,0342
		L-F1 35	0,0193	0,2229	0	0,4605	0,1241	0	0,0085	0,2970	st	0	0	0	0,0215	0,0383
		L-F1 36	0,1776	1,0348	0	4,5136	0,7788	0,3505	0	15,0714	0,9808	0	0,1467	0	0,2809	0,1432
PŮVODNÍ	ČESKÁ REPUBLIKA	L-F1 23	0,3956	2,216	0	1,6218	0,6548	0,1937	0,1231	2,4154	0,3714	0	0	0	0,1340	0,3459
		L-F1 24	0,633	3,8466	0	1,1568	1,101	0	0,1434	1,8686	0,009	0	0,2041	0,3957	0,0583	0,8103
		L-F1 25	0,761	0,7742	0	1,652	0,5982	0,2790	0,1724	2,9358	0,6152	0	0,0982	0,4431	0	0,2392
		L-F1 26	0,4888	0,8544	0	0,6794	0,4236	0,2116	0,1633	0,2546	0,0900	0,0977	0,1790	0	st	0,091
		L-F1 27	0,9956	2,4486	0	1,7376	0,9668	0,267	0,3672	1,9302	1,171	0,0933	0	0	0,0706	0,1341
	ŠPANĚLSKO	L-F1 28	0,1532	1,5576	0	0,5112	0,3242	0	0,0267	0,6876	st	0	0,3122	0	0,0155	0,2514
		L-F1 29	0,0811	0,8102	0	1,02	0,2864	0	0,0434	0,3802	st	0	0,1527	0	0,0088	0,1933
		L-F1 30	0,0444	0,2278	0	0	0,0582	0	0,0167	0,0584	st	0	0,0516	0	0	0,0712
		L-F1 31	0,5696	3,6692	0,1290	1,2032	1,2722	0	0,1302	4,2822	0,1954	0	0,6073	0	0,0959	0,4368
vybraná vlnová délka			A	A	A	A	A	B	A	A	A	A	B	B	B	B



Obr. 2: Chromatogram směsi 30 standardů. Měření při vlnové délce A (260 nm) je znázorněno červeně, modře při vlnové délce B (300 nm). Zobrazené očíslované píky představují: (1) galová kyselina; (2) 3,4-dihydroxybenzoová kyselina; (3) 4-hydroxybenzoová kyselina; (4) katechin; (5) 3-hydroxybenzoová kyselina; (6) chlorogenová kyselina; (7) vanilová kyselina; (8) kávová kyselina; (9) epikatechin; (10) syringová kyselina; (11) epigallokatechin gallat; (12) p-kumarová kyselina; (13) rutin; (14) kyselina ferulová; (15) myricitrin; (16) sinapová kyselina; (17) salicylová kyselina; (18) luteolin-7-glukosid; (19) anýzová kyselina; (20) naringin; (21) taxifolin; (22) 3,4,5-trimethoxybenzoová kyselina; (23) 5-fluorosalicilová kyselina; (24) myricetin; (25) trans-skořicová kyselina; (26) kvercetin; (27) luteolin; (28) naringenin; (29) kaempferol; (30) apigenin



Obr. 3: Chromatogram vybraného vzorku (L-F1 22) z Illinois červenou barvou je znázorněn chromatogram měřený při vlnové délce (A) 260 nm; modrou barvou je znázorněn chromatogram měřený při vlnové délce (B) 300 nm. Označené píky jsou látky, které byly ve vzorku detekovány: (1) 3,4-dihydroxybenzoová kyselina; (2) p-hydroxybenzoová kyselina; (3) chlorogenová kyselina; (4) vanilová kyselina; (5) chlorogenová kyselina; (6) kumarová kyselina; (7) ferulová kyselina; (8) 5-fluorosalicilová kyselina; (9) kaempferol; (10) luteolin

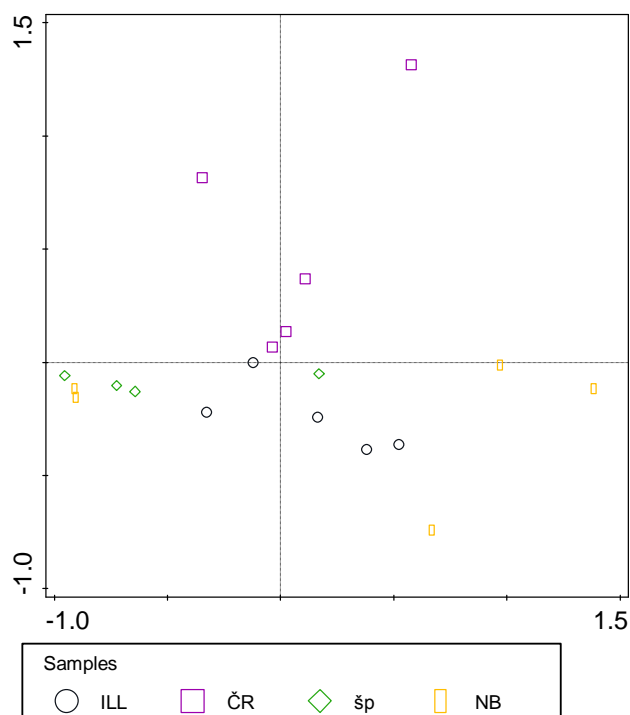
4.2 Statistické vyhodnocení vzorků

Na začátku experimentu jsem vyslovila předpoklad, že zastoupení a množství fenolických látek ve vzorcích se bude lišit. Větší množství bude v rostlinách vypěstovaných ze semen získaných v původním areálu (České republice a Španělsku) oproti rostlinám získaných z areálu invazního (Nebraska a Illinois).

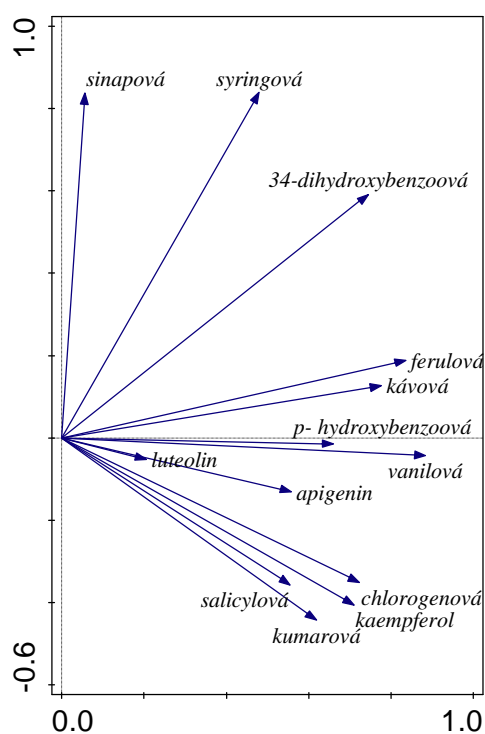
4.2.1 Variabilita fenolických látek ve vzorcích

Variabilitu výskytu fenolických látek ve vzorcích jsem nejprve zkoumala analýzou hlavních komponent PCA. Nepřímou analýzu jsem provedla dvakrát. Poprvé jsem vzorky centrovala a standardizovala přes druhy a podruhé je centrovala a standardizovala přes druhy a vzorky. V ordinačním diagramu (Obr. 4) se kolem středu shlukují tři vzorky z České republiky, pět z Illinois a jeden vzorek ze Španělska. Jejich poloha napovídá, že se jedná o vzorky bohaté na přítomnost fenolických látek. Na rozdíl od tří vzorků ze Španělska, pěti vzorků z Nebrasky a dvou vzorků z České Republiky, které jsou obsahově chudší a od skupiny se oddělují. Obsažené fenolické látky se oddělily do dvou směrů. K druhé kladné ose, se kterou jsou pozitivně korelovány dva vzorky z ČR, směřují kyselina sinapová, syringová a 3,4-dihydroxybenzoová. Zbývající kyseliny, především kyselina ferulová, kávová, vanilová, p-hydroxybenzoová, chlorogenová, jsou pozitivně korelovány s první kladnou osou, kde se nachází skóry dvou vzorků z Nebrasky (Obr. 5).

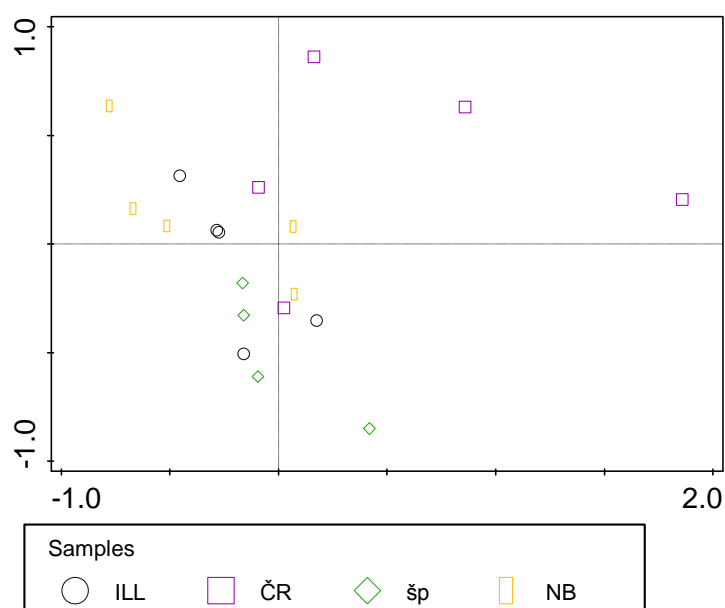
Standardizací PCA analýzy přes druhy i vzorky se většina skóru k sobě přiblížila až na tři vzorky z České republiky, které stojí stranou (Obr. 6). Tato úprava zvýšila variabilitu ve směru fenolických látek (Obr. 7). S první kladnou osou jsou korelovány kyselina syringová, sinapová, 3,4-dihydroxybenzoová, kávová a ferulová. Směrem k druhé záporné ose do oblasti výskytu skóru vzorku ze Španělska směřuje apigenin a kyselina salicylová, p-hydroxybenzoová. Kyselina kumarová, chlorogenová a luteolin jsou korelovány s druhou kladnou osou, kde jsou přítomné skóry vzorků z Nebrasky.



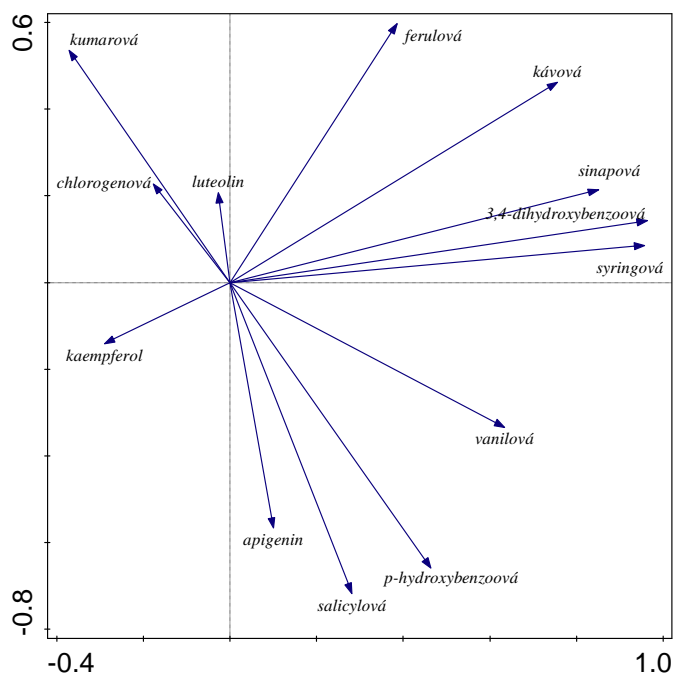
Obr. 4: Scatter plot: Variabilita fenolických látek ve vzorcích – nepřímá analýza PCA (centrovaná a standardizovaná přes druhy) první vodorovná osa vysvětluje 41,4% variability v datech, druhá svislá 18,8% variability v datech.



Obr. 5 Scatter plot: Variabilita fenolických látek ve vzorcích - nepřímá analýza PCA (centrovaná a standardizovaná přes druhy) první vodorovná osa vysvětluje 41,4% variability v datech, druhá svislá 18,8% variability v datech. Rozložení vzorků z téže analýzy je patrné v Obr. 4.



Obr. 6: Scatter plot: Variabilita fenolických látek ve vzorcích - nepřímá analýza PCA (standardizovaná přes druhy i vzorky), první vodorovná osa vysvětluje 32,7% variability v datech, druhá svislá osa vysvětluje 18,7% variability v datech.

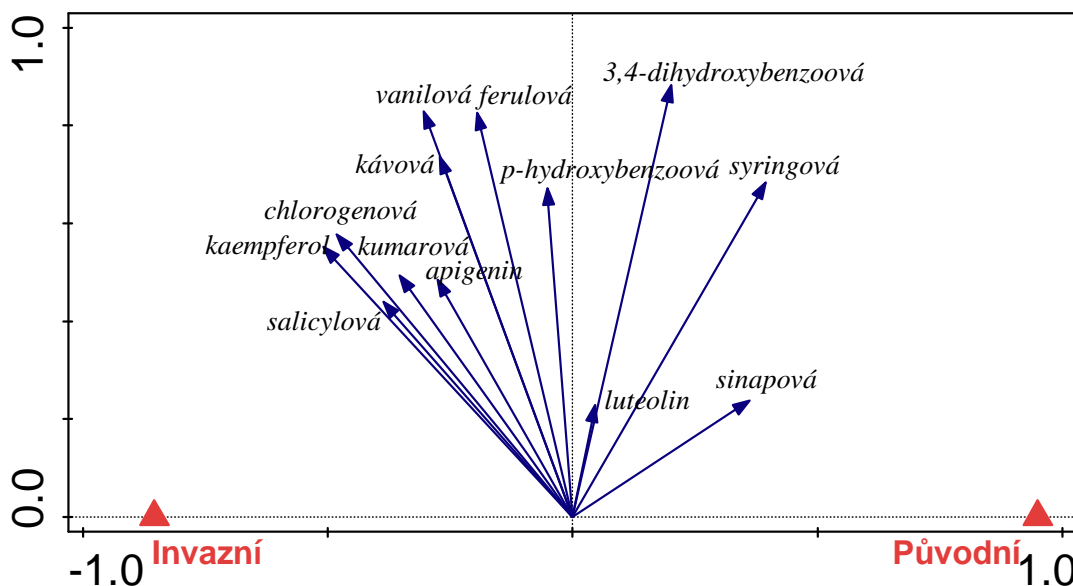


Obr. 7: Scatter plot: Variabilita fenolických látek ve vzorcích- nepřímá analýza PCA (standardizovaná přes druhy i vzorky), první vodorovná osa vysvětluje 32,7% variability v datech, druhá svislá osa vysvětluje 18,7% variability v datech. Rozložení vzorků z této analýzy je patrné v Obr. 6

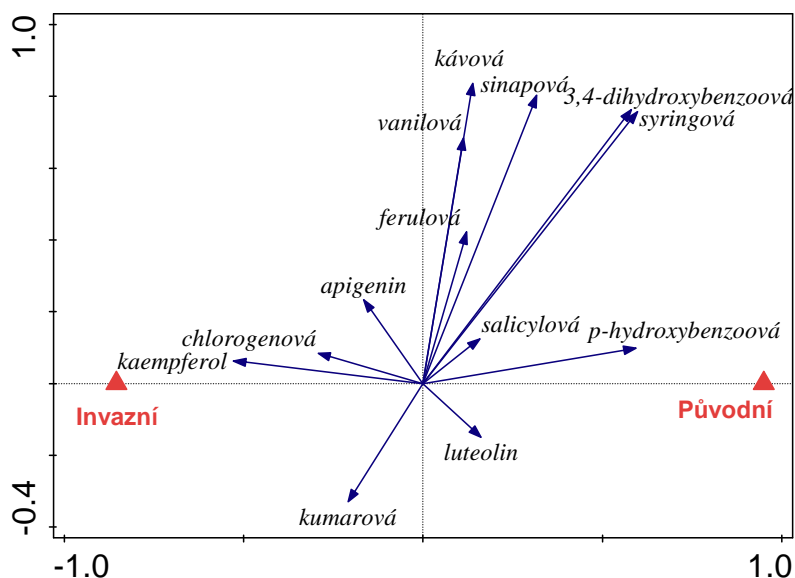
4.2.2 Rozdíly v obsahu fenolických látek v závislosti na původním/invazním areálu.

RDA analýzou (centrovaná a standardizovaná přes druhy) jsem nepotvrdila závislost mezi obsahem fenolických látek a areálem výskytu rostliny. Signifikance byla testována pomocí permutačního souboru s 499 permutacemi. Hodnota permutačního testu byla statisticky neprůkazná ($p = 0,076$), nicméně se hodnota testu nacházela blízko hranice průkaznosti. Úpravou parametrů analýzy, kdy jsem data centrovala a standardizovala přes druhy i vzorky, se závislost mezi obsahem fenolických látek a areálem rostliny stala statisticky průkazná ($p = 0,022$). To naznačuje, že se vzorky liší v relativním obsahu látek, pokud vezmeme v úvahu rozdíly v celkových množstvích.

Jak je patrné z ordinačního diagramu (Obr. 8) v RDA analýze standardizované přes druhy se většina fenolických látek přiklání k invaznímu areálu, pouze kyselina 3,4-dihydroxybenzoová, syringová, sinapová jsou kladně korelovány se skóry původního areálu. Pokud je analýza centrovaná přes druhy i vzorky, výskyt fenolických látek se zvýší ve prospěch původního areálu (Obr. 9). Se skóre původního areálu jsou kladně korelovány kyselina, p-hydroxybenzoová, 3,4- dihydroxybenzoová, kávová, vanilová, sinapová, syringová. Naopak v areálu invazním převažuje množství kaempferolu, kyseliny chlorogenové a kumarové.



Obr. 8: Biplot – Závislost výskytu fenolických látek na areálu rostliny - přímá lineární RDA analýza (standardizovaná a centrovaná přes druhy), vodorovná kanonická osa vysvětluje 10,6% varianty, druhá svislá (nekanonická osa) vysvětluje 38,6 % variability $F = 2,0165$; $P = 0,076$.

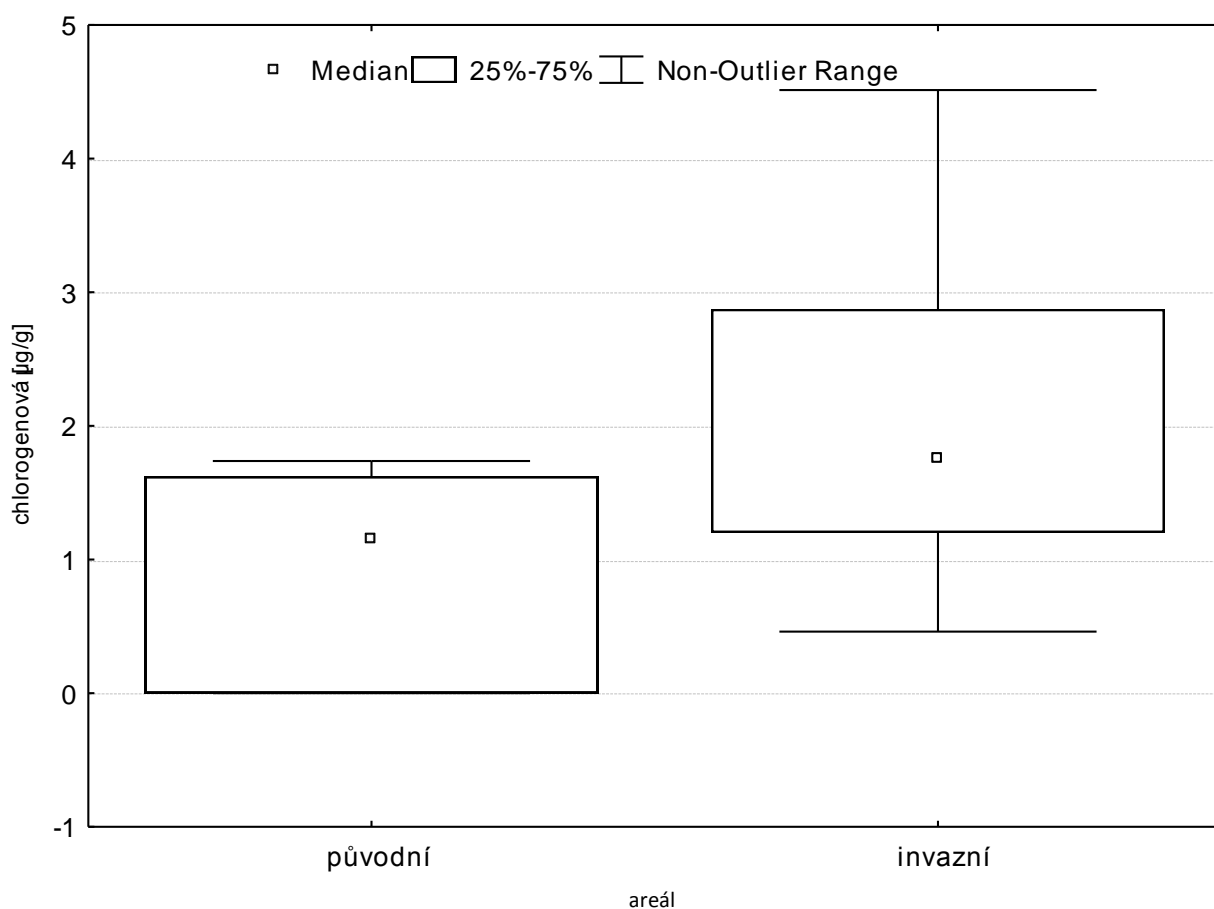


Obr. 9: Biplot - Vztah mezi výskytem fenolických látek v areálu rostlin – nmn Přímá RDA analýza (centrovaná a standardizovaná přes druhy i vzorky) – $P = 0,022$, $F = 2,5266$. První vodorovná kanonická osa vysvětluje 12, 94% variability. Druhá svislá nekanonická osa vysvětluje 26 % variability.

Všechny fenolické látky jsem testovala také neparametrickou analýzou variance a zkoumala jejich závislost na areálu. Statisticky prokazatelný rozdíl fenolické látky v areálu byl pouze u kyseliny chlorogenové ($p = 0,0373$), která se ve větších koncentracích vyskytovala v invazním areálu (Obr. 10). U ostatních fenolických látek nebyl statistický prokazatelný rozdíl v množství v závislosti na areálu (Tab. 7).

Tab. 7 Neparametrická analýza závislosti fenolické látky na areálu. Průkazně odlišné hodnoty jsou zvýrazněny červeně.

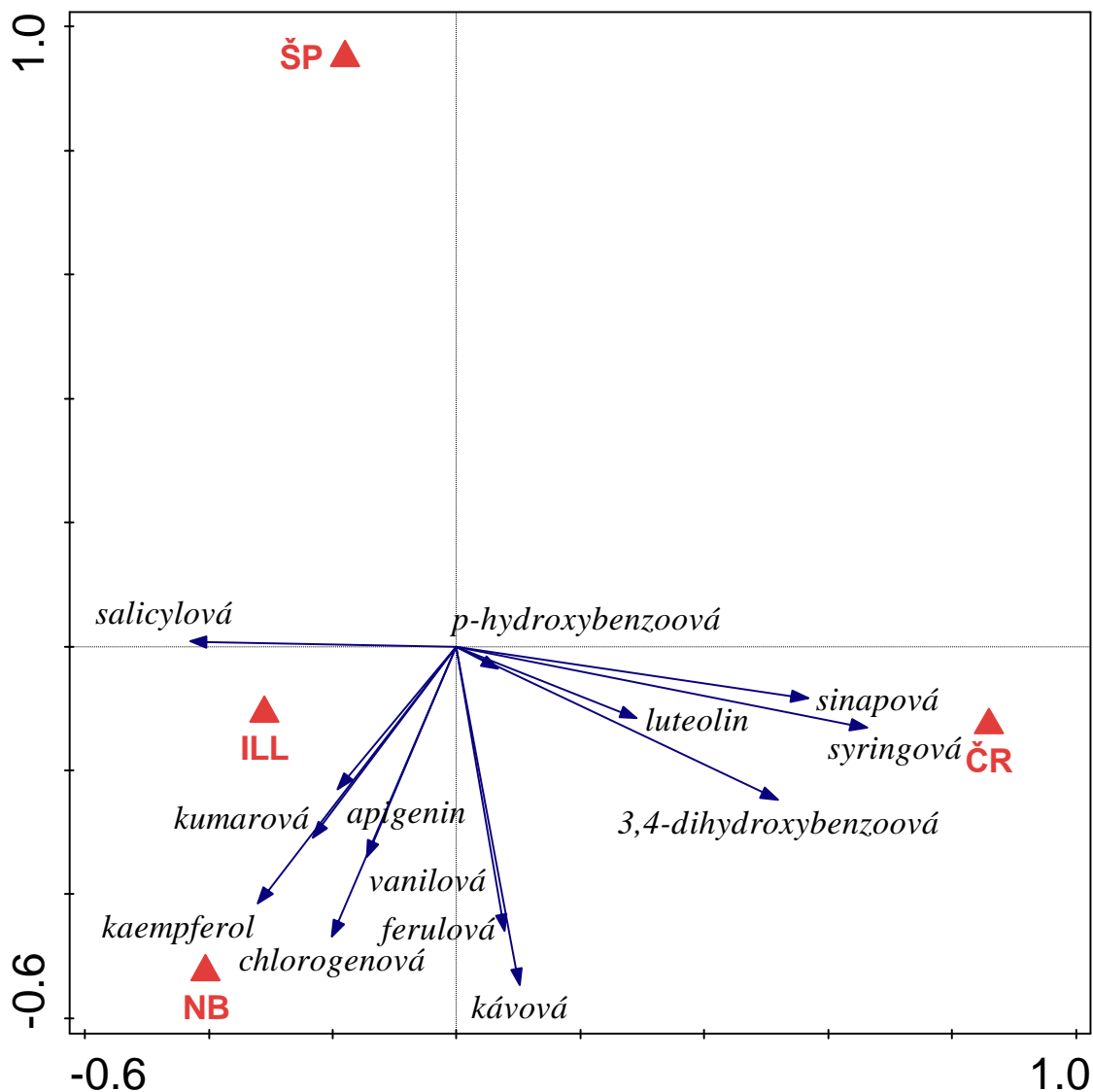
Fenolická látka	chi-square	p
3,4-dihydroxybenzoová	2,5544	0,1100
p-hydroxybenzoová	0,0586	0,8087
m-hydroxybenzoová	1,1728	0,2788
chlorogenová	4,3372	0,0373
vanilová	1,3511	0,2451
kávová	1,3511	0,2451
syringová	2,5544	0,1100
kumarová	1,3511	0,2451
ferulová	1,3511	0,2451
sinapová	2,4837	0,1150
salicylová	1,3511	0,2451
luteolin	0,1478	0,7007
kaempferol	1,3511	0,2451
apigenin	0,0586	0,8087



Obr. 10: Boxplot – neparametrická analýza variance: rozdíl v koncentraci kyseliny chlorogenové v původním/invazním areálu

4.2.3 Rozdíly obsahu fenolických látek v závislosti na státu.

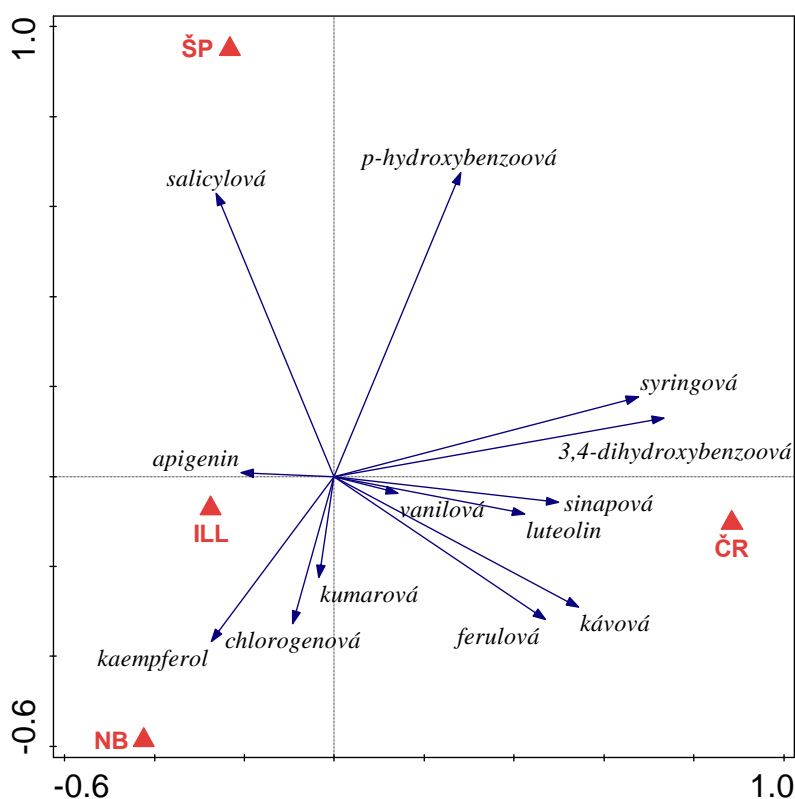
Rozdíly v množství fenolických látek v jednotlivých státech, ze kterých byly získány semena rostlin, nebyly statisticky průkazné v případě RDA analýzy, standardizované pouze přes druhy. P hodnota se ale velice blížila hranici průkaznosti ($p = 0,058$). I v tomto případě jsem upravila parametry analýzy a hodnoty jsem centrovala a standardizovala přes druhy i vzorky. Rozdíly v množství fenolických látkách v jednotlivých státech byly statisticky prokazatelné $p = 0,004$.



Obr. 11: Biplot - Vztah mezi výskytem fenolických látek v závislosti na zemi, Přímá RDA analýza (centrovaná a standardizovaná přes druhy): Kanonické osy vysvětlují 25, 04 % variability (12, 1 %; 9,8%; 3,2%) $P = 0,058$; $F = 1,6700$.

Jak je patrné z ordinačního diagramu (Obr. 11), ve vzorcích z České republiky jsou ve větších koncentracích zastoupeny kyselina syringová, sinapová, 3,4-dihydroxybenzoová, p-hydroxybenzoová a luteolin. Stranou stojí vzorky ze Španělska, v nichž se ve zvýšené míře nevyskytují žádné fenolické látky. Naopak vzorky z invazního areálu z Nebrasky a Illinois jsou si velice podobné ve výskytu fenolických látek. Ve vzorcích z Nebrasky se ve větších koncentracích vyskytuje kyselina chlorogenová, vanilová a kaempferol a ve vzorcích z Illinois kyselina kumarová a apigenin.

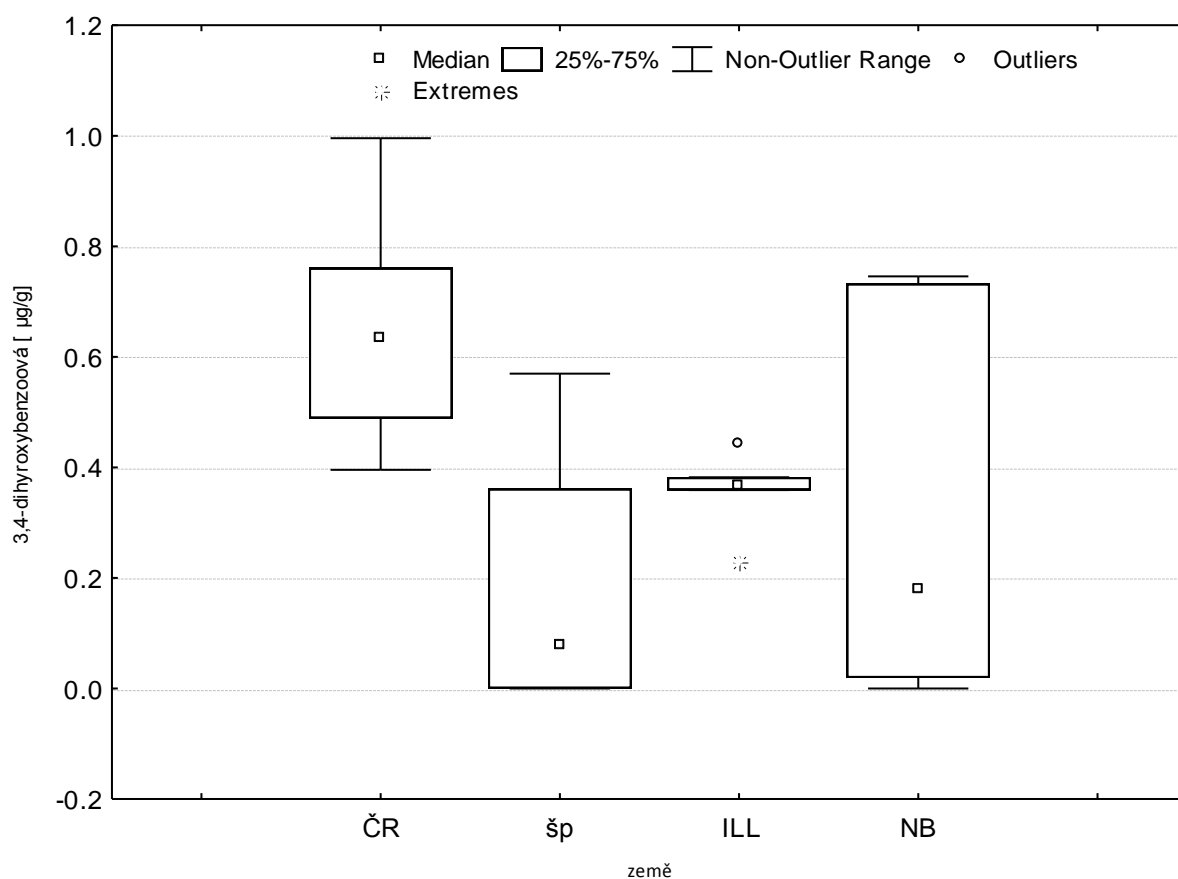
Standardizací RDA analýzy přes druhy a vzorky se podoba ordinačního diagramu a zastoupení fenolických látek v zemích poněkud změní. Zastoupení fenolických látek v jednotlivých státech původního a invazního areálu zobrazuje Obr. 12. Podle této analýzy se příliš nezmění zastoupení fenolických kyselin v českých vzorcích, kde je ve zvýšené koncentraci zastoupena kyselina syringová, sinapová, 3,4-dihydroxybenzoová, kávová, ferulová a luteolin. Naopak změna nastává ve vzorcích ze Španělska, kde se objevuje kyselina salicylová. Vzorky z invazního areálu jsou na výskyt fenolických látek chudší. Ve vzorcích z Nebrasky se ve zvýšené míře nachází kyselina chlorogenová a kaempferol, ve vzorcích z Illinois apigenin.



Obr. 12: Biplot: Vztah mezi výskytem fenolických látek v závislosti na zemi. Přímá RDA analýza (centrovaná a standardizovaná přes druhy a vzorky). Kanonické osy vysvětlují 30,13 % variability (17,2 %; 10,7%; 2,2%). $P = 0,004$; $F = 2,1564$

Provedením neparametrické analýzy variance (**Chyba! Nenalezen zdroj odkazů.**), jsem zjistila statisticky prokazatelné rozdíly v obsahu fenolických látek v jednotlivých státech u kyseliny 3,4-dihydroxybenzoové ($p = 0,0466$), syringové ($p = 0,0466$) a chlorogenové ($p = 0,0247$).

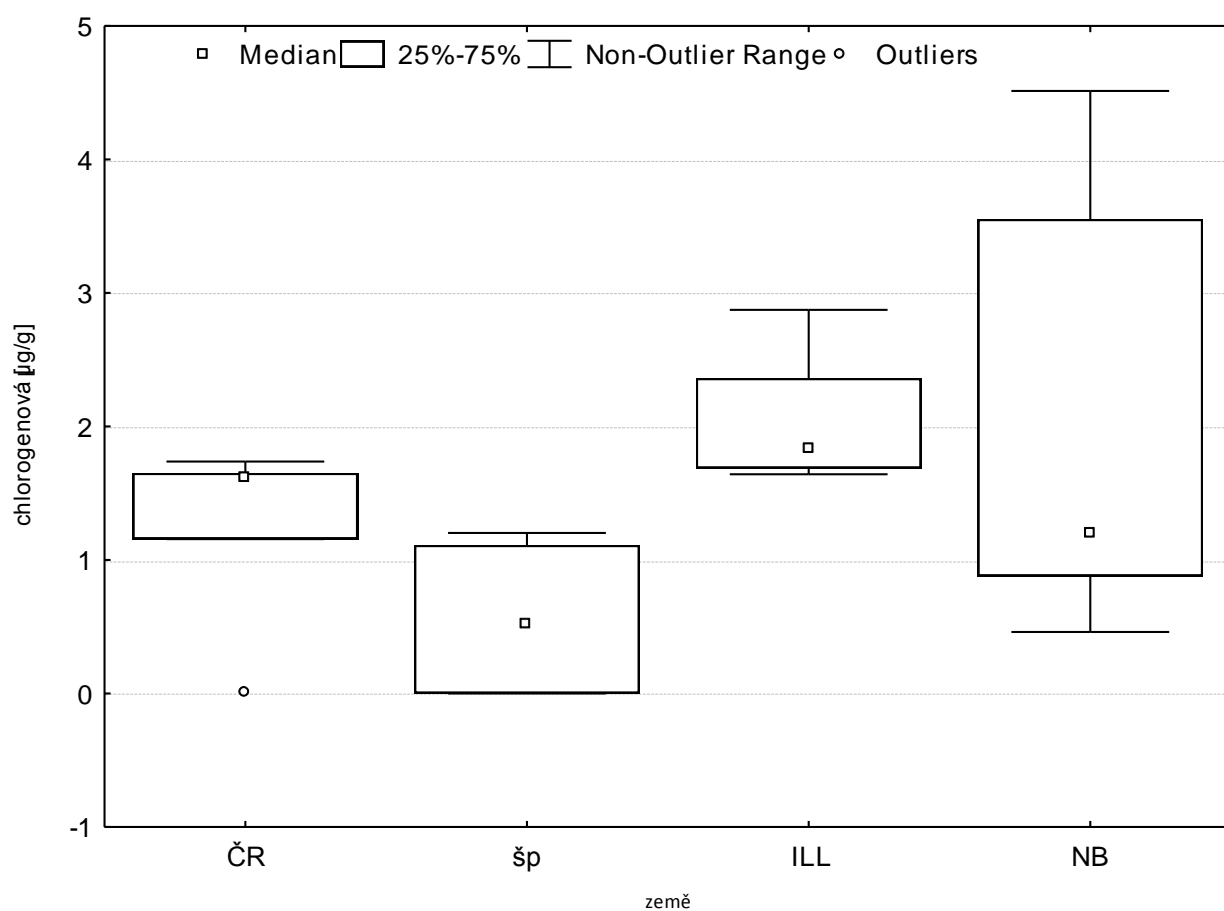
Největší koncentrace kyseliny 3,4- dihydroxybenzoové byly ve vzorcích z České republiky, naopak nejnížší ve vzorcích ze Španělska (Obr. 13). Nejvyšší koncentrace kyseliny chlorogenové byla ve vzorcích z Nebrasky a Illinois (Obr. 14). Množství kyseliny syringové bylo nejvyšší ve vzorcích z České republiky (Obr. 15).



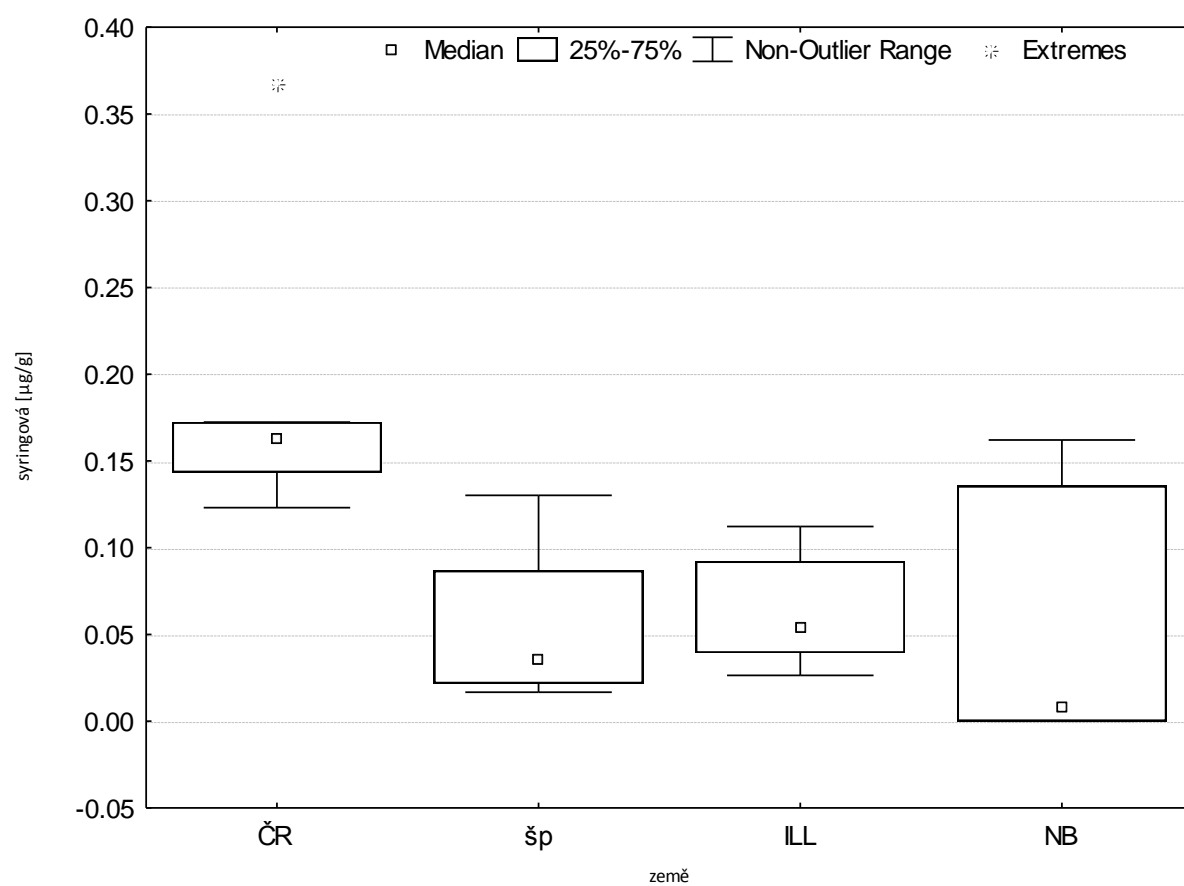
Obr. 13: Boxplot - neparametrická analýza variance kyseliny 3,4-dihydroxybenzoové ve čtyřech státech (p = 0,0466)

Tab. 8: Neparametrická analýza variance fenolických látek v zemi, ze které byla získaná mateřská rostlina. Průkazně odlišné hodnoty jsou zvýrazněny červeně

Fenolická látka	chi-square	p
3,4 - dihydroxybenzoová	7,9694	0,0466
p- hydroxybenzoová	1,5517	0,6704
m-hydroxybenzoová	3,9583	0,2660
chlorogenová	9,3733	0,0247
vanilová	1,5517	0,6704
kávová	4,5600	0,2070
syringová	7,9694	0,0466
kumarová	1,5517	0,6704
ferulová	4,5600	0,2070
sinapová	6,2588	0,0997
salicylová	3,7578	0,2888
luteolin	6,6229	0,0849
kaempferol	1,5517	0,6704
apigenin	3,7578	0,2888



Obr. 14 Boxplot- neparametrická analýza variance kyseliny chlorogenové ve státech ($p = 0,0247$)



Obr. 15: Boxplot - neparametrická analýza variance kyseliny syringové ve státech ($p = 0,0466$)

5 Diskuze

5.1 Sekundární metabolity v pcháči osetu (*Cirsium arvense*)

Pro porovnání rozdílů v obsahu sekundárních metabolitů mezi rostlinami z původního/invazního areálu jsem vybrala fenolické kyseliny a flavonoidy. Jordon-Thaden & Louda (2003) označuje tuto skupinu jako nejvíce zastoupenou v rodě *Cirsium*. Jsou to látky, které hrají důležitou úlohu v obraně rostliny před herbivory (Lattanzio, et, al 2006). Toto tvrzení podporuje Ruuhola et al. (2001), na základě pokusu s třemi druhy vrb, které se odlišovaly v množství salicylátů, kyseliny chlorogenové a myricetinu (*Salix pentandra*, *Salix phylicifolia*, *Salix myrsinifolia*). Larvy píďalky podzimní *Operophtera brumata*., které konzumovaly vrby s vyšším obsahem kyseliny chlorogenové a salicylátů dosahovaly menších velikostí, než ty, které se krmily vrbami s nižšími koncentracemi těchto látek. Paradoxně larvy, které požíraly listy s vyšším obsahem myricetinu byly větší.

Prvním úkolem bylo zjistit jaké fenolické látky a v jakých koncentracích se vyskytují v extraktech z rostliny *Cirsium arvense*. Pro stanovení přítomných látek jsme sestavila metodu obsahující 30 standardů složených jak z fenolických látek hojně uváděnými v literatuře tak i z látek jejichž přítomnost v pcháčích uváděny nebyly.

HPLC analýzou metanolových extraktů z listů *Cirsium arvense* jsem objevila přítomnost kyseliny 3,4-dihydroxybenzoové, p-hydroxybenzoové, chlorogenové, ferulové, kávové vanilové, syringové. Přítomnost těchto fenolických kyselin potvrzuje i Kenny et al. (2014). Provedl HPLC analýzu etanolových a vodných extraktů z *Cirsium arvense*. Na rozdíl od mé analýzy nezjistil přítomnost kyseliny syringové, která se v mých vzorcích vyskytovala. Naše výsledky se lišily i v přítomnosti kyseliny galové, kterou na rozdíl ode mne ve vzorcích detekoval. V mých vzorcích jsem objevila i kyselinu sinapovou a salicylovou a v jednom případě i kyselinu m-hydroxybenzoovou.

Ze skupiny flavonoidů jsme detekovala téměř ve všech vzorcích kaempferol, apigenin a v několika vzorcích i luteolin. Přítomnost kaempferolu je ve shodě s výčtem flavonoidů v přehledu pro *Cirsium arvense* (Jordon-Thaden and Louda 2003) stejně jako i přítomnost luteolinu a apigeninu, kterou potvrzuje i Kenny et al. (2014). Na rozdíl od mých výsledků popisuje i přítomnost kvercetinu a luteolin-7-glukosidu, které jsem ve vzorcích očekávala, ale nedetekovala.

Ačkoliv jsem ve všech vzorcích zjistila přítomnost stejných látek, byly některé vzorky na druhy fenolických látek chudší. Existuje možnost, že všechny vyjmenované látky, které jsem ve vzorcích detekovala, se mohly vyskytovat i v chudších vzorcích, ale jejich koncentrace byla tak nízká, že již byla pod hranicí detekce a nedokázala jsem je určit. Toto tvrzení by se dalo aplikovat i pro kyselinu galovou, kvercetin, luteolin-7-glukosidu, které jsem ve vzorcích očekávala, ale nedetekovala, přestože jsou v literatuře hojně uváděny.

5.2 Závislost množství fenolických látek na areálu (původní/nepůvodní)

Podle předpokladu hypotézy EICA, by vzorky rostlin z původního areálu měly obsahovat vyšší množství fenolických látek než vzorky z areálu nepůvodního, protože není potřeba tolika chemických zbraní na boj s přirozenými nepřáteli (Blossey and Nötzold 1995). Vzorky jak z původního tak i invazního areálu si byly velice podobné v množství fenolických látek. Celková koncentrace fenolických látek, však mluví pro podporu hypotézy EICA. Fenolické látky se ve vyšší celkové koncentraci vyskytovaly ve vzorcích z původního areálu. Je však zajímavé, že žádná fenolická látka se v původním areálu nevyskytovala v prokazatelné vyšší koncentraci. Naopak prokazatelný rozdíl byl patrný v případě kyseliny chlorogenové, která se ve vyšší koncentraci vyskytovala v invazním areálu. Vzorky z původního a invazního areálu se od sebe odlišovaly i spektrem látek. V původním areálu se vyskytovaly ve vyšších koncentracích kyselina sinapová, syringová a 3,4-dihydroxybenzoová, v areálu nepůvodním ostatní látky.

Pro podporu hypotézy EICA mluví podobně postavený experiment, který provedli Johnson et al. (2007) na krytém záhonu, v experimentální zahradě, kde pěstovali několik populací rostlin zlatobýlu kanadského (*Solidago gigantea*) z původního a invazního areálu. V listech a oddencích rostlin z původního areálu v Severní Americe a nepůvodním areálu v Evropě analyzovaly koncentrace terpenů. V tomto experimentu, bylo oproti našemu experimentu, použito více populací z rozsáhlejšího počtu zemí jak z původního tak invazního areálu. Jako zábrana před skreslením výsledků, byly rostliny pěstovány pod hliníkovým oknem a dle potřeby byly stříkány fungicidy a insekticidy. Analýzou vzorků z listů a oddenků rostlin zjistili větší množství monoterpenů a diterpenů v původním areálu v Severní Americe.

Experiment, který ve většině předpokladů podporuje hypotézu EICA, ale v našem společném cíli ji spíše popírá, je experiment, který provedli vědci ve Švýcarsku, kde Stastny et al. (2005) pěstovali v zahradních podmínkách starček přímětník (*Senecio*

jacobaea). Rostlina byla získána z původního prostředí v Evropě a z invazního prostředí na Novém Zélandu. Rostliny nechaly volně vystavené působení specializovaného herbivora (*Longitarsus jacobaeae*). Nepůvodní rostliny dosahovaly větší výšky i plodnosti i přes to, že byly více poškozené činností herbivora. Mezi rostlinami však byl rozdíl v obsahu pyrrolizidinových alkaloidů, které ve větší míře produkovaly nepůvodní druhy rostlin. Tento výsledek, který upozorňuje na vyšší množství sekundárních metabolitů kvalitativní povahy v invazních rostlinách podporuje hypotézu SDH (Doorduyn and Vrieling 2011).

5.3 Rozdíly v obsahu fenolických látek v závislosti na státu

Statisticky prokazatelné rozdíly byly mezi populacemi z jednotlivých států. Pro velký obsah kyseliny 3,4-dihydroxybenzoové, syringové, sinapové a luteolinu se od ostatních vzorků lišily vzorky z České republiky, naopak vzorky ze Španělska byly na zastoupení látek obecně chudší až na zvýšený výskyt kyseliny salicylové. Naopak vzorky z invazního areálu byly poměrně homogenní a vykazovali zvýšené koncentrace kyseliny chlorogenové, kaempferolu, apigeninu.

Rozmanitost v populacích pozorovala i Huberty a kol. (2014), když porovnávala rozdíly v obsahu glukosinolátů v rukvi rakouské (*Rorippa austriaca*) v rostlinách z původního areálu z České republiky a z nepůvodního areálu v Nizozemí a Německu. Na závěr by se dalo říci, že homogenní výskyt fenolických kyselin a flavonoidů naznačuje, že geny těchto syntetických drah zůstávají zapojeny jak v původním tak invazním areálu. Podobnou rozmanitost v rámci listových terpenů popisuje i Johnson et al. (2007), a poukazuje na fakt, že se tak rostliny v rámci areálu mohou setkávat s rozmanitým zastoupením látek. K tomuto tvrzení se přiklání i (Joshi and Vrieling 2005), který uvádí kolísání alkaloidu jacobinu v populaci *Senecio jacobaea* v rozmezí od 4-78% v nativním rozmezí a od přibližně 35 do 160% v nepůvodním prostředí.

6 Závěr

V této práci jsem testovala pravdivost hypotézy EICA na rozdílech v koncentracích sekundárních metabolitů v pcháči osetu (*Cirsium arvense*). Tato rostlina se původně vyskytovala v Evropě a Asii, ale nyní je rozšířená na všech čtyřech kontinentech. Naše pokusné rostliny byly získány z původního evropského a nepůvodního severoamerického kontinentu

Vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií jsem analyzovala devatenáct vzorků. Sada analyzovaných vzorků byla pro každý stát (Česká republika, Illinois, Nebraska a Španělsko) tvořena 5 vzorky, výjimku tvořily vzorky ze Španělska, kde bylo o jeden vzorek méně. V pcháčích jsem dohromady detekovala přítomnost jedenácti fenolických kyselin: 3,4-dihydroxybenzoová, p-hydroxybenzoová, m-hydroxybenzoová, chlorogenová, vanilová, kávová, syringová, kumarová, ferulová, sinapová a salicylová kyselina a tři flavonoidů: luteolin, kaempferol, apigenin. Zastoupení fenolických látek a jejich koncentrace se napříč vzorky lišila.

Ve vzorcích z původního areálu byla zjištěna vyšší celková koncentrace fenolických látek, ale ve vzorcích z invazního areálu se ve vyšších koncentracích vyskytovala kyselina chlorogenová. Rozdíly v množství fenolických látek v jednotlivých státech ukázaly, že v České republice se ve větší míře vyskytovala kyselina syringová a 3,4-dihydroxybenzoová. Ve vzorcích z Nebrasky kyselina chlorogenová.

7 Seznam literatury

- Abela-Hofbauerová, Inés, and Zuzana Münzbergová. 2011. "Increased Performance of *Cirsium Arvense* from the Invasive Range." *Flora - Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants* 206(12):1012–19.
- Amor, RL, and RV Harris. 1974. "Distribution and Seed Production of *Cirsium Arvense* (L.) Scop, in Victoria, Australia." *Weed Research* 14:317–23.
- Asadi, Ghorbanali, Reza Ghorbani, Javad Karimi, Alireza Bagheri, and Heinz Mueller-Schaerer. 2013. "Host Impact and Specificity of Tortoise Beetle (*Cassida Rubiginosa*) on Canada Thistle (*Cirsium Arvense*) in Iran." *Weed Technology* 27(2):405–11.
- Bacher, S., and F. Schwab. 2000. "Effect of Herbivore Density, Timing of Attack and Plant Community on Performance of Creeping Thistle *Cirsium Arvense* (L.) Scop.(Asteraceae)." *Biocontrol Science and Technology* 10:343–52.
- Blossey, B., and R. Nötzold. 1995. "Evolution of Increased Competitive Ability in Invasive Nonindigenous Plants: A Hypothesis." *Journal of Ecology* 83:887–89.
- Bossdorf, Oliver et al. 2005. "Phenotypic and Genetic Differentiation between Native and Introduced Plant Populations." *Oecologia* 144(1):1–11.
- Bureš, Petr. 2004. "*Cirsium* MILL. - Pcháč." Pp. 385–419 in *Květena České republiky 7*, edited by Bohumil Slavík, Jitka Štěpánková, Jan Štěpánek, and Radmila Bělohlávková. Praha: Academia.
- Burns, Erin E., Deirdre A. Prischmann-Voldseth, and Greta G. Gramig. 2013. "Integrated Management of Canada Thistle (*Cirsium Arvense*) with Insect Biological Control and Plant Competition under Variable Soil Nutrients." *Invasive Plant Science and Management* 6(4):512–20.
- Catford, Jane a., Peter a. Vesk, David M. Richardson, and Petr Pyšek. 2012. "Quantifying Levels of Biological Invasion: Towards the Objective Classification of Invaded and Invasible Ecosystems." *Global Change Biology* 18(1):44–62.
- Colautti, Robert I., Anthony Ricciardi, Igor a. Grigorovich, and Hugh J. MacIsaac. 2004. "Is Invasion Success Explained by the Enemy Release Hypothesis?" *Ecology Letters* 7(8):721–33.
- Cripps, Michael G. et al. 2010. "Enemy Release Does Not Increase Performance of *Cirsium Arvense* in New Zealand." *Plant Ecology* 209(1):123–34.
- Cripps, Michael G., André Gassmann, et al. 2011. "Classical Biological Control of *Cirsium Arvense*: Lessons from the Past." *Biological Control* 57(3):165–74.

- Cripps, Michael G., Graeme W. Bourdôt, et al. 2011. "Influence of Insects and Fungal Pathogens on Individual and Population Parameters of *Cirsium Arvense* in Its Native and Introduced Ranges." *Biological Invasions* 13(12):2739–54.
- Doorduyn, Leonie J., and Klaas Vrieling. 2011. "A Review of the Phytochemical Support for the Shifting Defence Hypothesis." *Phytochemistry reviews : proceedings of the Phytochemical Society of Europe* 10(1):99–106.
- Felker-Quinn, Emmi, Jennifer a Schweitzer, and Joseph K. Bailey. 2013. "Meta-Analysis Reveals Evolution in Invasive Plant Species but Little Support for Evolution of Increased Competitive Ability (EICA)." *Ecology and evolution* 3(3):739–51.
- Formisano, Carmen et al. 2007. "Composition and Allelopathic Effect of Essential Oils of Two Thistles: *Cirsium Creticum* (Lam.) D.'Urv. Ssp. *Triumfetti* (Lacaita) Werner and *Carduus Nutans* L." *Journal of Plant Interactions* 2(2):115–20.
- Fukano, Yuya, and Tetsukazu Yahara. 2012. "Changes in Defense of an Alien Plant *Ambrosia Artemisiifolia* before and after the Invasion of a Native Specialist Enemy *Ophraella Communa*." *PloS one* 7(11):e49114.
- Guggisberg, Alessia et al. 2012. "Invasion History of North American Canada Thistle, *Cirsium Arvense*." *Journal of Biogeography* 39(10):1919–31.
- Harborne, J. B., and C. a Williams. 2000. "Advances in Flavonoid Research since 1992." *Phytochemistry* 55(6):481–504.
- Huberty, Martine, Katja Tielbörger, Jeffrey a Harvey, Caroline Müller, and Mirka Macel. 2014. "Chemical Defenses (glucosinolates) of Native and Invasive Populations of the Range Expanding Invasive Plant *Rorippa Austriaca*." *Journal of chemical ecology* 40(4):363–70.
- Chon, S-u, Y-m Kim, and J-c Lee. 2003. "Herbicidal Potential and Quantification of Causative Allelochemicals from Several Compositae Weeds." (1995):444–50.
- Jäger, Heinke, Alan Tye, and Ingo Kowarik. 2007. "Tree Invasion in Naturally Treeless Environments: Impacts of Quinine (*Cinchona Pubescens*) Trees on Native Vegetation in Galápagos." *Biological Conservation* 140(3-4):297–307.
- Jeong, Da Mi, Hyun Ah Jung, and Jae Sue Choi. 2008. "Comparative Antioxidant Activity and HPLC Profiles of Some Selected Korean Thistles." *Archives of Pharmacal Research* 31(1):28–33.
- Johnson, Robert H., Helen M. Hull-Sanders, and Gretchen a. Meyer. 2007. "Comparison of Foliar Terpenes between Native and Invasive *Solidago Gigantea*." *Biochemical Systematics and Ecology* 35(12):821–30.
- Jordon-Thaden, Ingrid E., and Svata M. Louda. 2003. "Chemistry of *Cirsium* and *Carduus*: A Role in Ecological Risk Assessment for Biological Control of Weeds?" *Biochemical Systematics and Ecology* 31(12):1353–96.

- Joshi, J., and K. Vrieling. 2005. "The Enemy Release and EICA Hypothesis Revisited: Incorporating the Fundamental Difference between Specialist and Generalist Herbivores." *Ecology Letters* 8(7):704–14.
- Keane, Ryan M., and Michael J. Crawley. 2002. "Exotic Plant Invasions and the Enemy Release Hypothesis." 17(4):164–70.
- Kenny, O. et al. 2014. "Investigating the Potential of under-Utilised Plants from the Asteraceae Family as a Source of Natural Antimicrobial and Antioxidant Extracts." *Food Chemistry* 161:79–86.
- Kenny, O. et al. 2014. "Investigating the Potential of under-Utilised Plants from the Asteraceae Family as a Source of Natural Antimicrobial and Antioxidant Extracts." *Food chemistry* 161:79–86.
- Kozyra, Małgorzata, and Kazimierz Głowniak. 2013. "Phenolic Acids in Extracts Obtained from the Flowering Herbs of *Cirsium Vulgare* (Savi) Ten. Growing in Poland." *Acta Societatis Botanicorum Poloniae* 82(4):325–29.
- Lattanzio, V., VMT Lattanzio, and Angela Cardinali. 2006. "Role of Phenolics in the Resistance Mechanisms of Plants against Fungal Pathogens and Insects." *Phytochemistry: Advances in ...* 661(2):23–67.
- Liu, YaoBin, YuanMing Zhang, Robert S. Nowak, and Liliya Dimeyeva. 2013. "Diaspore Characteristics and Ecological Adaptation of *Bromus Tectorum* L. from Different Distribution Regions." *Journal of Arid Land* 5(3):310–23.
- Louda, S. M. 1997. "Ecological Effects of an Insect Introduced for the Biological Control of Weeds." *Science* 277(5329):1088–90.
- Lu, Yanhua, Wei Song, Xinhua Liang, Dongzhi Wei, and Xiaoli Zhou. 2009. "Chemical Fingerprint and Quantitative Analysis of *Cirsium Setosum* by LC." *Chromatographia* 70(1-2):125–31.
- Marga, Françoise, Thomas C. Pesacreta, and Karl H. Hasenstein. 2001. "Biochemical Analysis of Elastic and Rigid Cuticles of *Cirsium Horridulum*." *Planta* 213(6):841–48.
- Marková, Zuzana, and Martin Hejda. 2011. "Invaze Nepůvodních Druhů Rostlin Jako Environmentální Problém." *Živa* 1:10–14.
- Mikulka, Jan. 2011. *Metody Regulace Pcháče Rolního (Cirsium Arvense L. Scop) Na Zemědělské Půdě*. 1st ed. Praha: Výzkumný ústav rostlinné výroby v. v. i.
- Mikulka, Jan. 2013. "Biologie a Regulace Pcháče Rolního (*Cirsium Arvense* L . Scop .) v Cukrovce." *Listy cukrovarnické a řepářské* 129(5-6):172–76.
- Moore, R. J. 1975. "The Biology of Canadian Weeds. 13. *Cirsium Arvense* (L.)." *Canadian Journal of Plant Science* 55(May):1033–48.

- Müller-Schärer, Heinz, Urs Schaffner, and Thomas Steinger. 2004. "Evolution in Invasive Plants: Implications for Biological Control." *Trends in ecology & evolution* 19(8):417–22.
- Nalewajko-Sieliwoniuk, Edyta, Jolanta Nazaruk, Jolanta Kotowska, and Anatol Kojło. 2012. "Determination of the Flavonoids/antioxidant Levels in *Cirsium Oleraceum* and *Cirsium Rivulare* Extracts with cerium(IV)-Rhodamine 6G Chemiluminescence Detection." *Talanta* 96:216–22.
- Nazaruk, J. 2008. "Antioxidant Activity and Total Phenolic Content in *Cirsium* Five Species from North-East Region of Poland." *Fitoterapia* 79(3):194–96.
- Nuzzo, Victoria. 1997. "Element Stewardship Abstract for *Cirsium Arvense*." *The Nature Conservancy Arlington, VA*.
- Procházka, Stanislav, Ivana Macháčková, Jan Krekule, and Jiří Šebánek. 1988. *Fyziologie Rostlin*. 1st ed. Praha: Academia.
- Ruuhola, T., O. P. Tikkanen, and J. Tahvanainen. 2001. "Differences in Host Use Efficiency of Larvae of a Generalist Moth, *Operophtera Brumata* on Three Chemically Divergent *Salix* Species." *Journal of chemical ecology* 27(8):1595–1615.
- Saleem, a, J. Lojonen, K. Pihlaja, and E. Oksanen. 2001. "Effects of Long-Term Open-Field Ozone Exposure on Leaf Phenolics of European Silver Birch (*Betula Pendula* Roth)." *Journal of chemical ecology* 27(5):1049–62.
- Simmonds, Monique S. J. 2003. "Flavonoid–insect Interactions: Recent Advances in Our Knowledge." *Phytochemistry* 64(1):21–30.
- Skuhrovec, J., J. Mikulka, and J. Koprdoová. 2008. "How Can Seed Feeders Regulate Dispersion of Thistles , *Cirsium Arvense* and *C. Heterophyllum*?" *Journal of Plant Diseases and Protection* (21):0–3.
- Stachon, W. J., and R. L. Zimdahl. 1980. "Allelopathic Activity of Canada Thistle (*Cirsium Arvense*) in Colorado." *Weed Science* 28(1):83–86.
- Stastny, Michael, Urs Schaffner, and Elizabeth Elle. 2005. "Do Vigour of Introduced Populations and Escape from Specialist Herbivores Contribute to Invasiveness?" *Journal of Ecology* 93(1):27–37.
- Sun, Qian et al. 2012. "Simultaneous Analysis of 11 Main Active Components in *Cirsium Setosum* Based on HPLC-ESI-MS/MS and Combined with Statistical Methods." *Journal of separation science* 35(21):2897–2907.
- Taiz, Lincoln, and Eduardo Zeiger. 1998. *Plant Physiology*. 2nd ed. Sunderland, Mass: Sinauer Associates.
- Theis, Nina. 2006. "Fragrance of Canada Thistle (*Cirsium Arvense*) Attracts Both Floral Herbivores and Pollinators." *Journal of chemical ecology* 32(5):917–27.

- Theis, Nina, Manuel Lerchau, and Robert A. Raguso. 2007. "The Challenge of Attracting Pollinators While Evading Floral Herbivores: Patterns of Fragrance Emission in *Cirsium Arvense* and *Cirsium Repandum* (Asteraceae)." *International Journal of Plant Sciences* 168(5):587–601.
- Theis, Nina, and Robert a Raguso. 2005. "The Effect of Pollination on Floral Fragrance in Thistles." *Journal of chemical ecology* 31(11):2581–2600.
- Tiley, Gordon E. D. 2010. "Biological Flora of the British Isles: *Cirsium Arvense* (L.) Scop." *Journal of Ecology* 98(4):938–83.
- Urban, Jiří, and Bořivoj Šarapatka. 2003. "Regulace Plevelů." Pp. 126–43 in *Ekologické zemědělství: učebnice pro školy i praxi, 1.díl*. Praha: Ministerstvem životního prostředí ČR pro PRO-BIO.
- Williamson, MH, and Alastair Fitter. 1996. "The Characters of Successful Invaders." *Biological conservation* 3207(96):163–70.
- Wolf, Vera C., Ursula Berger, André Gassmann, and Caroline Müller. 2011. "High Chemical Diversity of a Plant Species Is Accompanied by Increased Chemical Defence in Invasive Populations." *Biological Invasions* 13(9):2091–2102.
- Zangerl, Arthur R., and May R. Berenbaum. 2005. "Increase in Toxicity of an Invasive Weed after Reassociation with Its Coevolved Herbivore." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102(43):15529–32.

Webové adresy

<http://chem.sis.nlm.nih.gov/chemidplus/>

8 Přílohy

nástřík 5 µl- vlnová délka A - [µg/g]

vzorek	země	areál	3,4-diOHbenzoová	p- hydroxy benzoová	m-hydroxy benzoová	chlorogenová	vanilová	kávoá	syringová	kumarová	ferulová	sinapová	salicylová	fluoro salicylová	luteolin	kaempferol	apigenin	VD	nástřík
IK_L-F1 18-3_01.	ILL	I	0,3838	3,6318	0,0000	2,2264	1,2916	0,0000	0,0000	7,5672	0,3370	0,0000	0,1008	478,6244	0	0,0776	0,1698	A	5
IK_L-F1 18-4_01.	ILL	I	0,5016	3,7704	0,0000	2,3222	1,3880	0,0000	0,0000	10,1072	0,5624	0,0000	0,3548	472,9082	0	0,0552	0,1724	A	5
IK_L-F1 18-5_01.	ILL	I	0,4468	4,0570	0,0000	2,5360	1,5306	0,0000	0,0000	8,2452	0,3722	0,0000	0,2748	528,2222	0	0,1184	0,1400	A	5
IK_L-F1 19-2_01.	ILL	I	0,3590	1,6912	0,0000	1,6420	0,7818	0,0000	0,0968	0,6924	0,0798	0,0000	0,0000	401,3728	0,0000	0,1298	0,8922	A	5
IK_L-F1 20-2_01.	ILL	I	0,3656	3,2812	0,0000	2,8736	0,6666	0,0000	0,0402	3,7826	0,3792	0,0000	0,2572	519,2272	0,0000	0,0118	0,0288	A	5
IK_L-F1 21-2_01.	ILL	I	0,2312	0,9102	0,0000	1,8268	0,4462	0,0000	0,0000	1,4444	0,0698	0,0000	0,1220	485,0944	0,0000	0,0812	0,0080	A	5
IK_L-F1 22-2_01	ILL	I	0,3822	2,6192	0,0000	1,6870	1,1088	0,0000	0,0624	2,3512	0,3644	0,0000	1,1176	367,8816	0,0000	0,2732	1,7184	A	5
IK_L-F1 23-2_01	ČR	P	0,3956	2,2160	0,0000	1,6218	0,6548	0,0000	0,1128	2,4154	0,3714	0,0000	0,0000	570,5894	0,0000	0,0870	0,2488	A	5
IK_L-F1 24-2_01	ČR	P	0,6330	3,8466	0,0000	1,1568	1,1010	0,0000	0,1304	1,8686	0,009	0,0000	0,0000	718,7788	0,0000	0,1086	0,0000	A	5
IK_L-F1 25-2_01	ČR	P	0,7610	0,7742	0,0000	1,6520	0,5982	0,0000	0,1378	2,9358	0,6152	0,0000	0,0000	522,0246	0,0000	0,0094	0,0308	A	5
IK_L-F1 26-2_01	ČR	P	0,4888	0,8544	0,0000	0,0000	0,4236	0,1754	0,1376	0,2546	0,0600	0,0000	0,0000	611,0380	0,0000	0,0000	0,0756	A	5
IK_L-F1 27-2_01.	ČR	P	0,9956	2,4486	0,0000	1,7376	0,9668	0,0000	0,2642	1,9302	1,1710	0,0000	0,0000	523,9716	0,0000	0,0310	0,0462	A	5
IK_L-F1 28-2_01	ŠP	P	0,1532	1,5576	0,0000	0,0000	0,6484	0,0000	0,0534	0,6876	0,0002	0,0000	0,7634	538,1256	0,0000	0,0144	0,1908	A	5
IK_L-F1 29-2_01	ŠP	P	0,0000	0,8102	0,0000	1,0200	0,2864	0,0000	0,0258	0,3802	0,0002	0,0000	0,0000	512,1180	0,0000	0,0000	0,1478	A	5
IK_L-F1 30-3_01	ŠP	P	0,0000	0,2278	0,0000	0,0000	0,0582	0,0000	0,0134	0,0584	0,0000	0,0000	0,0000	507,7694	0,0000	0,0000	0,0532	A	5
IK_L-F1 31-2_01	ŠP	P	0,5696	3,6692	0,0000	1,2032	1,2722	0,0000	0,1284	4,2822	0,1954	0,0000	0,7256	640,8488	0,0000	0,0522	0,1996	A	5
IK_L-F1 32-2_01	NB	I	0,7458	3,3734	0,0000	1,2020	2,6266	0,0000	0,1368	5,9520	1,1224	0,0000	0,2384	579,3484	0,0000	0,1986	0,2090	A	5
IK_L-F1 33-2_01	NB	I	0,7324	2,4922	0,0000	3,5536	2,5388	0,1818	0,1404	3,5170	0,8494	0,0000	0,4388	455,8504	0,0000	0,2566	5,0094	A	5
IK_L-F1 34-2_01	NB	I	0,0000	0,0966	0,0000	0,8784	0,1284	0,0000	0,0000	0,0588	0,0000	0,0000	0,0000	409,2480	0,0000	0,0000	0,0000	A	5
IK_L-F1 35-2_01	NB	I	0,0500	0,3148	0,0000	0,9784	0,2022	0,0000	0,0134	0,4080	0,0002	0,0000	0,0000	450,5246	0,0000	0,0390	0,0190	A	5
IK_L-F1 35-3_01	NB	I	0,0272	0,2484	0,0000	0,8636	0,1154	0,0000	0,0000	0,2936	0,0002	0,0000	0,0000	466,0600	0,0000	0,0272	0,0042	A	5
IK_L-F1 35-4_01	NB	I	0,0000	0,1182	0,0000	0,0000	0,0984	0,0000	0,0000	0,2414	0,0002	0,0000	0,0000	474,5318	0,0000	0,0242	0,0144	A	5
IK_L-F1 35-5_01	NB	I	0,0000	0,2100	0,0000	0,0000	0,0804	0,0000	0,0000	0,2448	0,0002	0,0000	0,0000	437,6170	0,0000	0,0000	0,0000	A	5

nástřík 5 µl- vlnová délka B - [µg/g]

vzorek	země	areál	3,4-diOHbenzoová	p- hydroxy benzoová	m-hydroxy benzoová	chlorogenová	vanilová	kávová	syringová	kumarová	ferulová	sinapová	salicylová	fluoro salicylová	luteolin	kaempferol	apigenin	VD	nástřík
IK_L-F1 18-3_01.	ILL	I	0,2910	94,7074	0,0000	2,1596	1,4200	0,0000	0,0000	7,6360	0,1614	0,0000	0,1340	376,3246	0,0000	0,0452	0,2170	B	5
IK_L-F1 18-4_01.	ILL	I	0,4208	177,1562	0,0000	2,0616	1,5262	0,0000	0,0000	9,9682	0,4018	0,0000	0,2126	354,9316	0,0000	0,0550	0,2378	B	5
IK_L-F1 18-5_01.	ILL	I	0,3478	28,7274	0,0000	2,3948	1,6612	0,0000	0,0000	8,2240	0,1976	0,0000	0,1812	400,4510	0,0000	0,0618	0,1770	B	5
IK_L-F1 19-2_01.	ILL	I	0,2306	0,0000	0,0000	1,4932	0,8472	0,0000	0,0852	1,0494	0,0002	0,0000	0,3150	407,8462	0,0000	0,0966	1,0192	B	5
IK_L-F1 20-2_01.	ILL	I	0,2774	16,5260	0,0000	2,6422	0,7476	0,2142	0,0360	3,6368	0,2044	0,0000	0,4812	404,5404	0,0000	0,0156	0,1994	B	5
IK_L-F1 21-2_01.	ILL	I	0,1144	7,2690	0,0000	1,7034	0,4918	0,0000	0,0000	1,4670	0,0002	0,0000	0,1118	359,6348	0,0000	0,0980	0,0376	B	5
IK_L-F1 22-2_01	ILL	I	0,2616	0,0000	0,0000	1,5406	1,1390	0,0000	0,3170	2,6980	0,0632	0,0000	0,1736	436,1304	0,0000	0,2542	1,7258	B	5
IK_L-F1 23-2_01	ČR	P	0,2472	36,5064	0,0000	1,2814	0,7404	0,0000	0,0818	2,7772	0,0626	0,0000	0,0000	470,0054	0,0000	0,1116	0,2818	B	5
IK_L-F1 24-2_01	ČR	P	0,4914	58,6264	0,0000	1,2072	1,2574	0,0000	0,1102	1,8708	0,0001	0,0000	0,2036	614,8224	0,0000	0,0330	0,0000	B	5
IK_L-F1 25-2_01	ČR	P	0,6256	20,6996	0,0000	1,6576	0,6666	0,3140	0,1532	2,8792	0,3564	0,0000	0,3564	441,9164	0,0000	0,0002	0,2256	B	5
IK_L-F1 26-2_01	ČR	P	0,1766	11,6994	0,0000	0,0000	0,4180	0,2116	0,1194	0,2902	0,0256	0,0000	0,0000	498,0186	0,0000	0,0000	0,0796	B	5
IK_L-F1 27-2_01	ČR	P	0,7270	20,7202	0,0000	1,4278	1,0612	0,2670	0,0846	2,0682	0,5018	0,0000	0,0000	409,8414	0,0000	0,0324	0,1134	B	5
IK_L-F1 28-2_01	ŠP	P	0,0832	2,2806	0,0000	0,8306	0,6652	0,0000	0,0548	0,6808	0,0002	0,0000	0,2700	448,1312	0,0000	0,0208	0,2228	B	5
IK_L-F1 29-2_01	ŠP	P	0,0000	8,4702	0,0000	0,8840	0,3098	0,0000	0,0210	0,4092	0,0002	0,0000	0,0000	416,3814	0,0000	0,0000	0,1734	B	5
IK_L-F1 30-3_01	ŠP	P	0,0000	10,5276	0,0000	0,0000	0,0760	0,0000	0,0168	0,0694	0,0000	0,0000	0,0000	419,0562	0,0000	0,0000	0,0584	B	5
IK_L-F1 31-2_01	ŠP	P	0,3232	13,2532	0,0000	1,0288	1,3620	0,0000	0,0808	4,1804	0,0840	0,0000	0,3788	569,4004	0,0000	0,0722	0,3796	B	5
IK_L-F1 32-2_01	NB	I	0,4132	14,9310	0,0000	1,1350	2,6410	0,0000	0,1566	5,9256	0,7086	0,0000	0,3424	465,6188	0,0000	0,2012	0,2452	B	5
IK_L-F1 33-2_01	NB	I	0,5266	4,3078	0,0000	2,9820	2,3122	0,4782	0,0884	3,1540	0,5656	0,0000	0,3672	367,4756	0,0000	0,2340	5,1272	B	5
IK_L-F1 34-2_01	NB	I	0,0000	0,0000	0,0000	0,7840	0,0726	0,0000	0,0000	0,0650	0,0000	0,0000	0,0000	340,8904	0,0000	0,0000	0,0000	B	5
IK_L-F1 35-2_01	NB	I	0,0168	1,4394	0,0000	0,8576	0,1642	0,0000	0,0170	0,5238	0,0000	0,0000	0,0002	381,3334	0,0000	0,0330	0,0466	B	5
IK_L-F1 35-3_01	NB	I	0,0122	0,0000	0,0000	0,7788	0,1108	0,0000	0,0000	0,3334	0,0002	0,0000	0,0000	383,0292	0,0000	0,0138	0,0034	B	5
IK_L-F1 35-4_01	NB	I	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,1022	0,0000	0,0000	0,2422	0,0002	0,0000	0,0000	384,2326	0,0000	0,0092	0,0270	B	5
IK_L-F1 35-5_01	NB	I	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0608	0,0000	0,0000	0,2716	0,0002	0,0000	0,0000	368,1940	0,0000	0,0000	0,0000	B	5
IK_L-F1 36-3_01	NB	I	0,0986	6,2314	0,0000	4,4262	0,7454	0,4142	0,0000	14,9910	0,7458	0,0000	0,0786	398,3468	0,0000	0,2560	0,1010	B	5

nástřík 10 µl- vlnová délka A – přepočet na [µg/g]

vzorek	země	areál	3,4- diOHbenzoová	p- hydroxy benzoová	m- hydroxy benzoová	chlorogenová	vanilová	kávová	syringová	kumarová	ferulová	sinapová	salicylová	fluoro salicylová	luteolin	kaempferol	apigenin	VD	nástřík
IK_L-F1 18-3_02	ILL	I	0,5880	4,1912	0,0000	2,2011	1,4712	0,0000	0,0000	7,9354	0,4661	0,0000	0,0842	519,1224	0,2436	0,0952	0,2011	A	10
IK_L-F1 18-4_02	ILL	I	0,7062	4,2755	0,0000	2,2455	1,5777	0,0000	0,0000	8,8441	0,5913	0,0000	0,0489	451,1525	0,4341	0,0629	0,2071	A	10
IK_L-F1 18-5_02	ILL	I	0,6845	4,5921	0,0000	2,4749	1,7229	0,1744	0,0792	8,5626	0,5057	0,0000	0,1960	515,8698	0,1325	0,1460	0,1850	A	10
IK_L-F1 19-2_02	ILL	I	0,6316	2,0325	0,0000	1,3487	0,8726	0,1330	0,1122	1,2438	0,0000	0,0000	0,5411	548,2642	0,0986	0,1549	1,0233	A	10
IK_L-F1 20-2_02	ILL	I	0,4860	3,7367	0,0000	2,8015	0,7454	0,0000	0,0543	3,3879	0,5491	0,0000	0,4298	510,8302	0,0000	0,0275	0,0899	A	10
IK_L-F1 21-2_02	ILL	I	0,3778	1,0497	0,0000	1,6302	0,5035	0,0000	0,0394	1,7348	0,1379	0,0000	0,1547	494,7431	0,0000	0,1006	0,0155	A	10
IK_L-F1 22-2_02	ILL	I	0,5861	3,2979	0,0000	1,4686	1,2268	0,0000	0,0922	3,0263	0,3128	0,0000	0,3368	586,2486	0,1071	0,3401	1,9802	A	10
IK_L-F1 23-2_02	ČR	P	0,7438	2,3964	0,0000	1,3743	0,7276	0,1390	0,1231	3,1984	0,4157	0,0000	0,0000	610,4964	0,0000	0,0919	0,2765	A	10
IK_L-F1 24-2_02	ČR	P	1,0425	4,2754	0,0000	0,8805	1,2403	0,0000	0,1434	1,4416	0,1873	0,0000	0,5304	874,9617	0,2485	0,1395	0,3092	A	10
IK_L-F1 25-2_02	ČR	P	1,0524	0,8451	0,0000	1,5975	0,6876	0,1875	0,1724	3,1712	0,7205	0,0000	0,2264	655,3560	0,1851	0,0000	0,0477	A	10
IK_L-F1 26-2_02	ČR	P	0,9035	0,9883	0,0000	0,6794	0,4994	0,0950	0,1633	0,3072	0,0900	0,0977	0,1195	739,8852	0,0000	0,0057	0,0680	A	10
IK_L-F1 27-2_02	ČR	P	1,5800	2,5888	0,0000	1,2963	0,9876	0,0918	0,3672	2,2996	0,9736	0,0933	0,0000	546,7418	0,0000	0,0351	0,0572	A	10
IK_L-F1 28-2_02	ŠP	P	0,0766	0,7788	0,0000	0,5112	0,3242	0,0000	0,0267	0,3289	0,0001	0,0000	0,3817	269,0628	0,0000	0,0072	0,0954	A	10
IK_L-F1 29-2_02	ŠP	P	0,0811	0,9223	0,0000	0,6119	0,3142	0,0000	0,0434	0,4211	0,0001	0,0000	0,7965	560,8537	0,0000	0,0125	0,1805	A	10
IK_L-F1 30-3_02	ŠP	P	0,0444	0,2330	0,0000	0,0000	0,0666	0,0000	0,0167	0,0877	0,0001	0,0000	0,0192	562,2527	0,0000	0,0000	0,0607	A	10
IK_L-F1 31-2_02	ŠP	P	0,6702	4,0718	0,1290	0,7898	1,3720	0,0000	0,1302	4,6020	0,2831	0,0000	0,2901	782,0291	0,0000	0,0449	0,2043	A	10
IK_L-F1 32-2_02	NB	I	0,7215	3,1731	0,0000	0,8675	2,4726	0,1358	0,1356	5,5274	0,9399	0,0000	0,0518	607,6440	0,0000	0,1990	0,2282	A	10
IK_L-F1 33-2_02	NB	I	0,7713	2,5856	0,0000	3,1946	2,6019	0,0000	0,1621	2,5939	0,8409	0,0000	0,2196	598,4204	0,0000	0,2788	5,2425	A	10
IK_L-F1 34-2_02	NB	I	0,0000	0,1586	0,0000	0,4562	0,0300	0,0000	0,0000	0,0511	0,0001	0,0000	0,0000	447,5280	0,0000	0,0172	0,0404	A	10
IK_L-F1 35-2_02	NB	I	0,0757	0,3668	0,0000	0,5447	0,1833	0,0000	0,0182	0,5392	0,0387	0,0000	0,0000	553,5523	0,0000	0,0523	0,0339	A	10
IK_L-F1 35-3_02	NB	I	0,0146	0,1358	0,0000	0,2184	0,0550	0,0000	0,0000	0,1730	0,0001	0,0000	0,0000	254,3096	0,0000	0,0144	0,0098	A	10
IK_L-F1 35-4_02	NB	I	0,0244	0,1724	0,0000	0,0000	0,0811	0,0000	0,0156	0,2488	0,0001	0,0000	0,0000	558,6394	0,0000	0,0214	0,0248	A	10
IK_L-F1 35-5_02	NB	I	0,0230	0,2874	0,0000	0,0000	0,0779	0,0000	0,0000	0,2849	0,0001	0,0000	0,0000	526,7348	0,0000	0,0131	0,0168	A	10
IK_L-F1 36-3_02	NB	I	0,1959	1,2313	0,0000	4,4823	0,7542	0,1641	0,0000	15,3774	1,3159	0,0000	0,3070	685,4859	0,0000	0,2960	0,0865	A	10

nástřik 10 µl- vlnová délka B-přepočet koncentrace na [µg/g]

vzorek	země	areál	3,4- diOHbenzoová	m- OHbenzoová	p- OHbenzoová	chlorogenová	vanilová	kávoá	syringová	kumarová	ferulová	sinapová	salicylová	fluoro salicylová	luteolin	kaempferol	apigenin	VD	nástřik
IK_L-F1 18-3_02	ILL	I	0,4025	114,5317	0,0000	2,0412	1,5962	0,2275	0,0000	7,7750	0,2734	0,0000	0,4533	420,3743	0,4273	0,0848	0,2477	B	10
IK_L-F1 18-4_02	ILL	I	0,5442	228,1792	0,0000	2,0776	1,7581	0,2956	0,0000	8,2838	0,3746	0,0000	0,4396	421,3152	0,4890	0,0610	0,2697	B	10
IK_L-F1 18-5_02	ILL	I	0,4861	32,9803	0,0000	2,3567	1,8158	0,2792	0,0512	8,6212	0,3346	0,0000	0,5380	470,9156	0,4754	0,1157	0,2686	B	10
IK_L-F1 19-2_02	ILL	I	0,3109	11,7400	0,0000	1,2773	0,9996	0,1668	0,0810	1,1435	0,0000	0,0000	0,1710	447,0908	0,0001	0,1150	1,1523	B	10
IK_L-F1 20-2_02	ILL	I	0,3286	33,0716	0,0000	2,6604	0,8333	0,1813	0,0323	3,6256	0,3360	0,0000	0,6955	457,2911	0,0000	0,0096	0,2525	B	10
IK_L-F1 21-2_02	ILL	I	0,1985	16,8426	0,0000	1,4792	0,5217	0,1281	0,0280	1,5867	0,0507	0,0000	0,2945	404,9482	0,0000	0,1255	0,0685	B	10
IK_L-F1 22-2_02	ILL	I	0,3530	42,8585	0,0000	1,3131	1,2291	0,0000	0,0599	3,0174	0,1467	0,0000	0,7538	472,0978	0,3136	0,2885	2,0087	B	10
IK_L-F1 23-2_02	ČR	P	0,3545	48,2692	0,0000	1,0464	0,7906	0,1937	0,0964	3,2182	0,1111	0,0000	0,0000	542,5388	0,0000	0,1340	0,3459	B	10
IK_L-F1 24-2_02	ČR	P	0,5782	76,0143	0,0000	0,8989	1,3493	0,0000	0,1175	1,5011	0,1408	0,0000	0,2041	689,2590	0,3957	0,0583	0,8103	B	10
IK_L-F1 25-2_02	ČR	P	0,7805	25,7649	0,0000	1,4422	0,7484	0,2790	0,1249	3,1285	0,4463	0,0000	0,0982	521,2308	0,4431	0,0000	0,2392	B	10
IK_L-F1 26-2_02	ČR	P	0,3216	24,4604	0,0000	0,4381	0,5207	0,1282	0,1635	0,3195	0,0960	0,0001	0,1790	573,5141	0,0000	0,0001	0,0910	B	10
IK_L-F1 27-2_02	ČR	P	0,8307	24,6578	0,0000	1,1885	1,1154	0,1401	0,0869	2,2341	0,3234	0,0664	0,0000	432,6661	0,0000	0,0706	0,1341	B	10
IK_L-F1 28-2_02	ŠP	P	0,1356	12,3475	0,0000	0,4650	0,7458	0,0000	0,0535	0,7580	0,0126	0,0000	0,3122	501,3921	0,0000	0,0155	0,2514	B	10
IK_L-F1 29-2_02	ŠP	P	0,0693	14,3302	0,0000	0,5457	0,3038	0,0000	0,0346	0,4922	0,0001	0,0000	0,1527	476,1364	0,0000	0,0088	0,1933	B	10
IK_L-F1 30-3_02	ŠP	P	0,0250	0,0000	0,0000	0,0000	0,0690	0,0000	0,0202	0,0969	0,0001	0,0000	0,0516	460,4482	0,0000	0,0000	0,0712	B	10
IK_L-F1 31-2_02	ŠP	P	0,4052	11,9531	0,0459	0,6899	1,4571	0,0000	0,0804	4,4062	0,1671	0,0000	0,6073	603,9775	0,0000	0,0959	0,4368	B	10
IK_L-F1 32-2_02	NB	I	0,3935	16,2750	0,0000	0,7983	2,5082	0,2646	0,1472	5,4582	0,6944	0,0000	0,7220	442,4044	0,0000	0,2025	0,2282	B	10
IK_L-F1 33-2_02	NB	I	0,6010	20,8946	0,0000	3,0548	2,6763	0,4080	0,1988	2,5432	0,5655	0,0000	0,5186	410,2939	0,0000	0,2371	5,3582	B	10
IK_L-F1 34-2_02	NB	I	0,0000	5,8216	0,0000	0,4169	0,0577	0,0000	0,0000	0,0783	0,0001	0,0000	0,0000	376,8319	0,0000	0,0175	0,0342	B	10
IK_L-F1 35-2_02	NB	I	0,0364	6,1588	0,0000	0,5007	0,1492	0,0000	0,0146	0,6496	0,0209	0,0000	0,0000	425,5070	0,0000	0,0454	0,0634	B	10
IK_L-F1 35-3_02	NB	I	0,0117	0,0000	0,0000	0,1997	0,0462	0,0000	0,0000	0,1991	0,0001	0,0000	0,0000	213,1404	0,0000	0,0114	0,0163	B	10
IK_L-F1 35-4_02	NB	I	0,0074	0,0000	0,0000	0,0000	0,0849	0,0000	0,0129	0,2561	0,0001	0,0000	0,0000	429,9431	0,0000	0,0168	0,0413	B	10
IK_L-F1 35-5_02	NB	I	0,0000	0,0000	0,0000	0,3828	0,0853	0,0000	0,0000	0,2947	0,0001	0,0000	0,0000	408,0195	0,0000	0,0125	0,0321	B	10
IK_L-F1 36-3_02	NB	I	0,1416	19,7973	0,0000	4,4886	0,7494	0,3505	0,0000	14,7509	1,0065	0,0000	0,1467	450,1929	0,0000	0,2809	0,1432	B	10

